

Vergleichende Darstellung und Quantifizierung
humanen Lungengewebes mit idiopathischer
pulmonaler Fibrose und zentrilobulärem
Emphysem mittels Micro-Computertomographie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Claudia Rebecca Schneider
aus Gießen

Gießen 2013

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie
Abteilung Diagnostische Radiologie
Leiterin: Frau Prof. Dr. Gabriele Krombach
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A.C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. S. Gattenlöhner

Tag der Disputation: 28.01.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Funktionelle Anatomie der humanen Lunge.....	1
1.1.1	Die Anatomie des Bronchialbaumes.....	1
1.1.2	Der Lungengefäßkreislauf	1
1.2	Die idiopathische pulmonale Fibrose	2
1.2.1	Epidemiologie	2
1.2.2	Usual interstitial pneumonia - das histologische Muster der IPF	3
1.2.3	Ätiologie	4
1.2.4	Pathomechanismus.....	5
1.2.5	Klinik	6
1.2.6	Diagnostik	6
1.2.7	Prognose.....	9
1.2.8	Therapie der Lungenfibrose.....	9
1.3	Das Lungenemphysem	10
1.3.1	Einführung	10
1.3.2	Epidemiologie	11
1.3.3	Klinik	11
1.3.4	Ätiologie und Pathogenese	11
1.3.5	Diagnostik	13
1.3.6	Prognose.....	15
1.3.7	Therapie	15
1.4	Die Micro-Computertomographie.....	16
1.5	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.....	17
2.	Material und Methoden.....	19
2.1	Technische Grundlagen der Micro-Computertomographie.....	19
2.2	Die Synchrotronstrahlung.....	21
2.3	Herkunft, Gewinnung und Bearbeitung der Gewebeproben	21
2.3.1	Übersicht über die Proben.....	21
2.3.2	Fixierung der Lungenproben.....	22
2.3.3	Präparation der mit Osmiumtetroxid kontrastierten Lungenproben	23
2.4	Präparation der intervaskular kontrastierten Lungenproben	26
2.4.1	Präparation der mit HgCl ₂ kontrastierten Lungenproben	27

2.5	Erstellung und Färbung der histologischen Schnittpräparate	27
2.5.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	27
2.5.2	Goldners-Masson-Trichome Färbung	28
2.6	Scannprozess und digitale Auswertung	29
2.6.1	Der Scanprozess	29
2.6.2	Vergleich von histologischen Präparaten und Micro-CT	30
2.6.3	Semiautomatische morphometrische Analyse der Mikro-CT Datensätze mit Hilfe der Analyse Software	31
2.6.4	Zweidimensionale Bildverarbeitung	33
2.6.5	Erstellung dreidimensionaler Darstellungen	33
2.6.6	Rekonstruktion eines Azinus	34
2.7	Statistische Auswertung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Kontrollproben	35
3.2	Fibrose	36
3.3	Emphysem	42
4.	Diskussion	46
5.	Zusammenfassung	57
5.1	Deutsch	57
5.2	Englisch	58
6.	Abkürzungsverzeichnis	59
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	62
7.1	Abbildungsverzeichnis	62
7.2	Tabellenverzeichnis	62
8.	Literaturverzeichnis	63
9.	Anhang	I
9.1	Übersicht über die Proben zur Darstellung und Quantifizierung des Parenchyms ..I	
9.2	Übersicht über die Proben zur Darstellung und Quantifizierung der Gefäße	II
10.	Publikationen	III
10.1	Originalarbeiten	III
10.2	Vorträge	III
10.3	Preise	III

11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	IV
12. Danksagung	V
13. Lebenslauf.....	VI

1. Einleitung

1.1 Funktionelle Anatomie der humanen Lunge

1.1.1 Die Anatomie des Bronchialbaumes

Die spezielle Geometrie des Bronchialbaums bedingt eine homogene Belüftung der terminalen Lufträume sowie die Schaffung einer möglichst großen Oberfläche. Nach Eintritt in das Lungengewebe teilen sich die beiden Hauptbronchien in 3 rechte und 2 linke Lappenbronchien, welche sich wiederum in Segmentbronchien verzweigen. Das weitere Teilungsmuster wird als irregulär dichotom bezeichnet, wobei sich der gemeinsame Querschnitt der Tochteräste gegenüber dem des Hauptstammes vergrößert. Es folgen weitere Teilungsgenerationen, wobei die Bronchioli terminalis den letzten Abschnitt der rein konduktiven Luftwege bilden. Der respiratorische Anteil, d.h. der Ort des Gasaustausches erstreckt sich von den Bronchioli respiratorii über Ductus alveolares (0,25-0,4mm), welche in den aus einzelnen Alveolen gebildeten Sacculi alveolares enden. Von der Trachea bis zu den Alveolen entfallen ca 15 Verzweigungen auf den konduktiven Teil, ca. 6-8 auf die Bronchioli respiratorii und Ductus alveolares. Als Gesamtlänge des Bronchialbaumes werden 15 cm angegeben, wobei davon nur etwa 0,9 cm den respiratorischen Anteil bilden.

Als Azinus werden alle Lufträume bezeichnet, die von einem einzigen Bronchiolus terminalis ausgehen und damit die funktionelle Einheit der Lunge darstellen. Der Durchmesser eines Azinus wird mit ca. 0,5 cm angegeben und umfasst 1500-4000 Alveolen. Ein Lobulus mit einem Durchmesser von 2 cm wird von mehreren Azini gebildet, von einem Bronchiolus versorgt und ist durch Bindegewebssepten begrenzt. Durch diese Teilungsarchitektur steigt die Gesamtoberfläche exponentiell an, von 2,54 cm² in der Trachea über 70 cm² in den luftleitenden Abschnitten bis zu etwa 140 m² in den Alveolen (Weibel 1997). In diesen insgesamt 300 Millionen Alveolen der menschlichen Lunge findet der Gasaustausch durch Diffusion über die 5-8 µm dicken Inter-alveolarsepten statt.

1.1.2 Der Lungengefäßkreislauf

Die meisten intrapulmonalen Gefäße sind Äste der A. Pulmonalis bzw. der Vv. Pulmonales und damit Vasa publica des Lungenkreislaufs. Die A. pulmonalis verläuft entlang der sich aufteilenden Bronchien, ihre Endäste, die Arteriolen, in den Inter-alveolarsepten und versorgen die Bronchioli respiratorii, die Ductus alveolares, die Bindegewebssepten und das subpleurale Gewebe. Nach etwa 7 Aufteilungsgenerationen haben die kleinen Arterien einen Durchmesser von etwa 2-3 mm, die daraus hervorgehenden Arteriolen messen 50-150 µm. Über Präkapilla-

ren von 40-70 μm Durchmesser gehen sie in die zahlreichen Alveolarkapillaren (6-9 μm) über, die ein dichtes Netzwerk ausbilden.

Die Versorgung der Bronchien bis zu den Bronchioli terminales, des peribronchialen Gewebes und der Lungenarterien erfolgt durch die Rr. Bronchiales und Vv. Bronchiales, die als sog. Vasa privata Teil des Körperkreislaufs sind. Sie verlaufen mit den Bronchien und entspringen aus der Aorta thoracica oder der 3. bzw. 4. A. intercostalis. Beide Gefäßsysteme sind durch Anastomosen miteinander verbunden. Die gesamte kapilläre Oberfläche einer Lunge eines Erwachsenen misst ca. 120m².

Der venöse Abfluss erfolgt aus den Postkapillaren in die 50-80 μm weiten Venulen und schließlich weiter in die größeren Venen, die in den Bindegewebslamellen zwischen den Segmenten zum Lungenhilus ziehen, wo sie sich zu den beiden Vv. Pulmonales vereinigen.

1.2 Die idiopathische pulmonale Fibrose

1.2.1 Epidemiologie

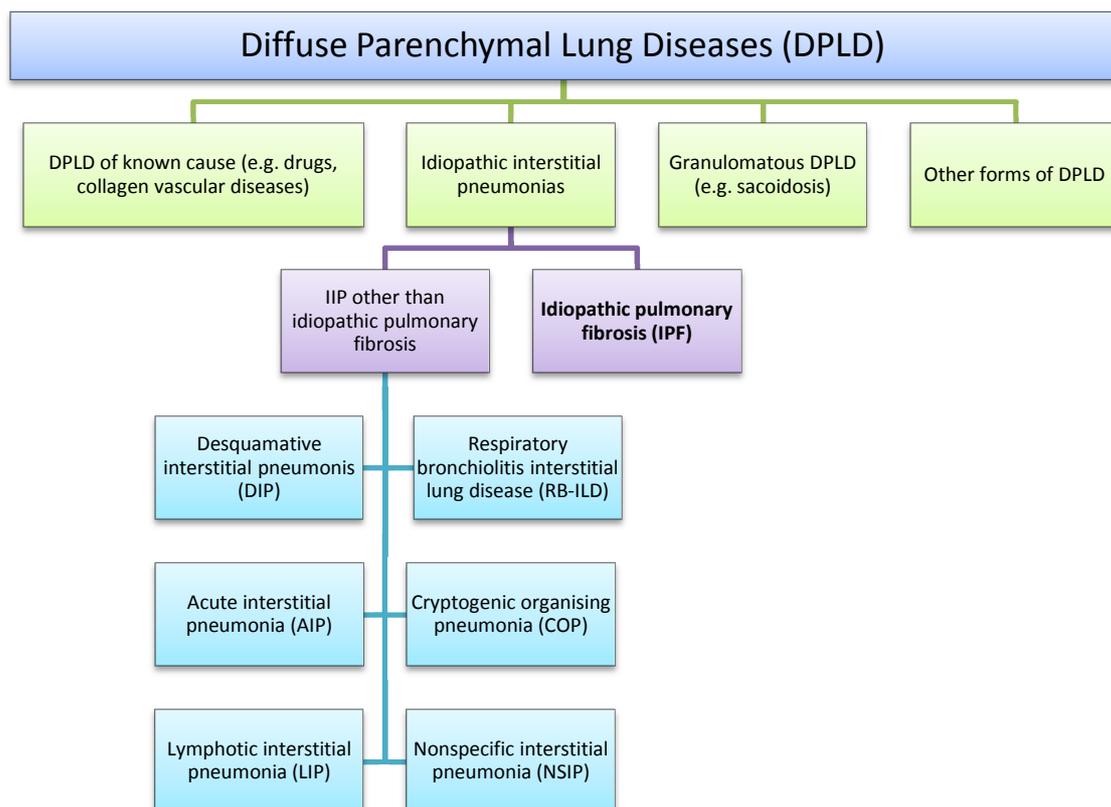


Abb. 1: Klassifizierung der DPLD

Die gebräuchlichste Klassifizierung wurde 2001 von der ATS/ERS erstellt und legt besonderen Wert auf die interdisziplinäre Interpretation von klinischen, radiologischen und pathologischen Befunden (ATS 2002)

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) wird auch als kryptogenische fibrosierende Alveolitis bezeichnet und stellt eine eigene Untergruppe der über 200 verschiedenen Typen umfassenden interstitiellen Lungenerkrankungen dar (Demedts et al. 2001).

Die Erkrankung zeigt ein weltweites Auftreten, wobei die Angaben in der Literatur zu Inzidenz bzw Prävalenz divergieren. Eine 1990 durchgeführte Fall-Kontroll Studie schätzte die Prävalenz für IPF auf etwa 3-6 Fälle/100.000 in der Allgemeinbevölkerung, wobei Männer häufiger als Frauen erkranken (Scott et al. 1990). 4 Jahre später fand eine populationsbasierende Studie in Bernalillo County, New Mexico, eine Prävalenz IPF von 20,2 (♂) bzw. 13,2 (♀) und eine Inzidenz von 10,7 (♂) bzw. 7;4 (♀) (Coultas/Hughes 1994). Die familiäre Form ist selten und hat z.B. in Großbritannien einen Anteil von < 1% (Demedts et al. 2001). Ein beschriebener Anstieg der diagnostizierten Erkrankung und ihrer Mortalität (Gribbin et al. 2006; Johnston et al. 1990; Wells et al. 1996) in den letzten Jahren ist nicht zuletzt durch die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten wahrscheinlich.

Etwa Zweidrittel sind bei Erstmanifestation älter als 60 Jahre, wobei das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei 66 Jahren liegt (ATS 2000).

1.2.2 Usual interstitial pneumonia - das histologische Muster der IPF

Das spezifische, histologische Muster einer fibrotisierenden interstitiellen Pneumonie ist die Usual interstitial pneumonia (UIP), welche erstmals 1998 von Katzenstein beschrieben wurde (Katzenstein/Myers 1998). Charakteristisch ist ein heterogener Wechsel von interstitieller Fibrose, Areale moderater Entzündung oder honigwabeförmiger Struktur und normalem Lungengewebe.

Der größte Anteil des fibrotisierten Gewebes besteht aus eosinophilem, azellulären Kollagen, dessen Ablagerung die Alveolarsepten verdickt und bizarre Narben formt. Weiterhin lassen sich dort kleine Aggregationen von proliferierenden Myofibroblasten und Fibroblasten (Kuhn et al. 1989; Katzenstein 1986) nachweisen, welche als Fibroblasten Foci bezeichnet werden. Diese Herde entstehen durch Organisation aus akut geschädigtem Lungengewebe bzw. sind im Zuge der Wundheilung auch in anderen Geweben zu finden (Myers/Katzenstein 1988; Kuhn et al. 1991). In der Diagnostik der UIP sind die Fibroblasten Foci essentiell, denn sie repräsentieren wahrscheinlich einen aktiven Krankheitsprozess. Durch Immunhistochemie wurde die gesteigerte Kollagensynthese durch die umliegenden Myofibroblasten bewiesen (Kuhn et al. 1989).

Die honigwabeförmigen Areale sind gekennzeichnet durch vergrößerte Lufträume, umgeben von bronchialem Epithel oder hyperplastischen Pneumozyten und getrennt durch verdickte

Septen. Sie entsprechen einer irreversiblen Neustrukturierung und Narbenbildung als Antwort auf einen chronischen Entzündungsprozess, ausgelöst durch eine Vielzahl von Ursachen und sind daher nicht spezifisch für die UIP. Ein alveolärer Kollaps und dessen Reorganisation scheint Teil der Pathogenese zu sein (Katzenstein 1985).

1.2.3 Ätiologie

Verschiedene Umwelteinflüsse, besonders mineralische, metallische bzw. Holz-, Stein- oder Sandstäube, werden für die Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht (Hubbard et al. 1996; Heppleston 1991). Auch die Viehhaltung, die Landwirtschaft oder Waldbrände können als externe Risikofaktoren die Entwicklung einer IPF begünstigen (Baumgartner et al. 2000; Taskar et al. 2006).



Abb. 2: Risikofaktoren einer IPF

Rauchen erhöht signifikant die Wahrscheinlichkeit, an einer IPF zu erkranken (Baumgartner et al. 1997; Cisneros-Lira et al. 2003). Weitere Studien geben Einblick auf Assoziation der IPF mit der gastroösophagealen Refluxkrankheit (Raghu et al. 2006; Salvioli et al. 2006; Raghu 2003; Ing 2001) oder Infektionskrankheiten. So wurde bei IPF Patienten eine hohe Inzidenz von Virusinfektionen mit Epstein-Barr, Influenza, Zytomegalie oder Hepatitis C nachgewiesen (Lok /Egan 2000; Pinsker et al. 1981; Tang et al. 2003; Yonemaru et al. 1997; Arase et al. 2008). Auch die Bedeutung des Diabetes mellitus in der Ätiologie der IPF wird diskutiert (Enomoto et al. 2003). Ebenso wird angenommen, dass Chemo- und Strahlentherapie als Ursache in Frage kommen (Adamson 1984; Pickrell et al. 1986; Coggle et al. 1986).

Die weitere Forschung beschäftigt sich mit dem genetischen bzw. erblichen Hintergrund der Krankheit, denn viele Menschen sind Risikofaktoren ausgesetzt, ohne eine IPF zu entwickeln. Ein erhöhtes Krankheitsrisiko besteht bei einem Polymorphismus des IL1 Rezeptorantagonisten und des TNF Alpha Gens (Whyte et al. 2000). Ebenso konnten bei Erkrankten eine Domi-

nanz des MZ Phenotyps des Alpha 1 Antitrypsinmangels und eine Instabilität oder Veränderung der Microsatelliten DNA nachgewiesen werden (Geddes et al. 1977; Vassilakis et al. 2000).

Seit langem werden außerdem verschiedene Fälle von familiär auftretender IPF mit mindestens 2 erkrankten Familienmitgliedern beschrieben (Marshall et al. 2000; Adelman et al. 1966; MacMillian 1951). Dabei wird ein autosomal dominanter Vererbungsmodus mit reduzierter Penetranz diskutiert (Marney et al. 2001; Steele et al. 2005). Bedeutend könnten dabei Mutationen des Surfactant codierenden Proteins C (Thomas et al. 2001; Markart et al. 2007; Lawson et al. 2004) oder verkürzte Telomerasen sein (Tsakiri et al. 2007, Garcia et al. 2007; Armanios et al. 2007; Cronkhite et al. 2008; Alder et al. 2008).

1.2.4 Pathomechanismus

Die exakte Pathogenese der Entstehung der IPF ist noch nicht geklärt. Dabei half besonders die Erforschung der durch das Zytostatikum Bleomycin induzierten Lungenfibrose im Tiermodell.

Die Entzündungshypothese basiert auf der Idee, dass eine Verletzung bzw. eine Schädigung des Gewebes dem fibrotischen Umbau bei IPF vorrausgeht (Keogh/Crystal 1982; Strieter 2001). Der Nachweis von Entzündungszellen und der erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine, wie etwa dem IL-1, dem TGF- β und dem TNF- α bei Patienten mit IPF unterstützt diese Auffassung und spricht für eine Imbalance zwischen den Th1 und den Th2 Zytokinprofilen (Keane/Strieter 2002; Kolb et al. 2001). Zu bedenken ist jedoch, dass die mikroskopisch nachgewiesenen entzündlichen Veränderungen lediglich moderat ausgeprägt sind (Katzenstein/Myers 1996) und eine Entzündung allein kein notwendiger Auslöser für eine fibrotische Reaktion bedeutet. So folgt auch auf einen hypoxisch bedingten Schaden des Alveolarepithels eine Fibrosierung (Adamson et al. 1988). Weiterhin lässt sich der Schweregrad nicht aus laborchemischen Entzündungsmarkern korrelieren (Peterson et al. 1987, Turner-Warwick et al. 1987) und durch eine langfristige Therapie mit antiinflammatorischen oder immunsuppressiven Medikamenten wird keine Verbesserung der Prognose erreicht (ATS 2000).

Eine zweite Hypothese über eine abnorme Wundheilungsreaktion wurde von Selman et al entwickelt (Selman et al. 2001; Selman et al. 2002). Hierbei führen rezidivierende Lungenverletzungen zu einer Schädigung und Aktivierung des Alveolarepithels. Dabei werden durch das Epithel diverse Zytokine und verschiedene Wachstumsfaktoren synthetisiert und sekretiert, wie etwa der PDGF, TNF- α oder TGF- β . Diese Mediatoren fördern die Fibroblastenmigration

sowie ihre Proliferation als auch die Differenzierung zu Myofibroblasten, welche über unterschiedliche Transmittersysteme die Apoptose von Epithelzellen, die Angiogenese und den Abbau der Basallamina bedingen. Die Folgen dieser Signalkaskaden äußern sich in einer gestörten Reepithelialisierung, einer übersteigerten und gestörten Kollagenproduktion oder einer fehlerhaften Fibrinolyse und münden in einem abnormalen Umbau des gesamten Lungenparenchyms.

Eine Hypothese wird als "multiple hit Hypothese" bezeichnet. Ihre Vertreter postulieren, dass sich die IPF als Konsequenz aus Fehlern in den biologischen Signalwegen entwickelt. Diese Anomalien können sowohl in Kaskaden, welche zum einem die Wundheilung betreffen, als auch zum anderen ein Teil von Entzündungsprozessen sein können, auftreten. Damit vereint diese dritte Hypothese die Gedanken der beiden ersten. In Microarray Untersuchungen zeigte sich ein spezifisches IPF Muster, welches auf eine Steigerung von Genen hinweist, die sowohl einen bindegewebigen Umbauprozess als auch einen Entzündungsprozess regulieren (Zuo et al. 2002).

1.2.5 Klinik

Die Symptome beginnen sukzessive unter dem Symptom der Dyspnoe, (Turner-Warwick et al. 1980), häufig in Kombination mit einem trockenen Husten (Dempsey et al. 2006). In bis zu 50% entwickeln die Patienten Uhrglasnägel und Trommelschlegelfinger (Kanematsu et al. 1994). Auch eine Assoziation zu Arthritis bzw. Arthralgien ist beschrieben (Johnston 1977; Turner-Warwick et al. 1980). In der Auskultation der Lunge fällt ein endinspiratorisches Knisterrasseln auf, welches initial basal betont beginnt, sich im Krankheitsverlauf aber über die gesamte Lunge ausbreiten kann (ATS 2002). Zeichen eines Rechtsherzversagens und periphere Ödeme kennzeichnen hingegen ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium.

1.2.6 Diagnostik

Die interdisziplinäre Diagnostik der IPF stützt sich auf verschiedene diagnostische Säulen (s. Abb.3). Die Basis bildet dabei die Anamnese, in der besonders eine mögliche Exposition zu den Risikofaktoren in Beruf oder Freizeit eruiert werden muss.

Das Routinelabor der Patienten ist normal oder zeigt unspezifische Veränderungen (ATS 2000) wie eine erhöhte BSG, eine Hypergammaglobulinämie oder eine Erhöhung der LDH.

Wie typischerweise bei ILD entwickeln die Patienten eine restriktive Ventilationsstörung unterschiedlicher Ausprägung und Schweregrades in der Lungenfunktionsprüfung, mit der Verminderung der in Tab.1 aufgeführten spirometrischen Parameter. Nicht beeinträchtigt sind hingegen die Resistance und der Tiffeneau-Index (FEV1%VC). Es ist erwiesen, dass Niko-

tinabusus die ursprünglich präsentierten Befunde modifiziert und eine erhöhte TLC und FVC vortäuscht, was wahrscheinlich durch die komorbide Entwicklung eines Emphysems bedingt ist (Mura et al. 2006; Cherniack et al. 1995). Die DLCO ist ein sehr sensitiver Marker, der auch prognostische Relevanz besitzt (Xaubet et al. 1998; Hamada et al. 2007).

Vitalkapazität (VC)
Totale Lungenkapazität (TLC)
Thorakales Gasvolumens (TGV)
Residualvolumen (RV)
Statische Compliance
Diffusionskapazität für CO (DLCO)

Tab. 1: Verminderte Lungenparameter bei IPF

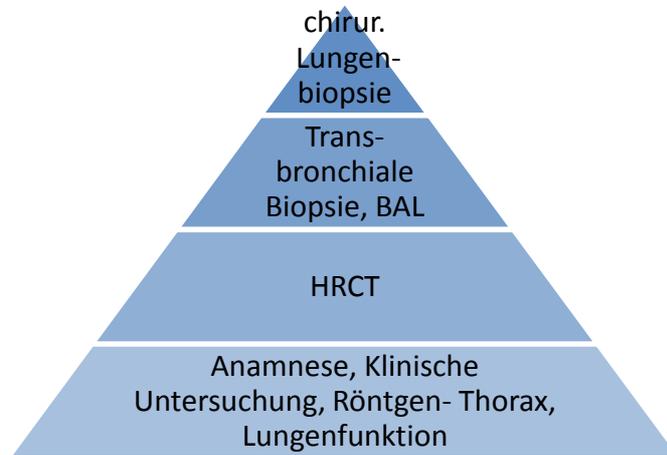


Abb. 3: Stufenweise Diagnostik der IPF

Die BAL enthält massenhaft Neutrophile, ihre Anzahl korrespondiert mit den radiologisch nachweisbaren retikulären Veränderungen im HRCT (Wells et al. 1994). Teilweise ist auch ein leichter Anstieg der Lymphozyten und Eosinophilen nachweisbar (Veeraraghavan et al. 2003). Es besteht eine lineare Beziehung zwischen einem hohen Anteil an Neutrophilen und der Mortalität (Kinder et al. 2008).

Die Lungenaufnahme kann bei den Patienten ohne Pathologie sein (Epler et al. 1978). Andernfalls imponieren periphere, retikuläre Verschattungen, die basal betont auftreten, zusammen mit einer Honigwabenlunge oder einem Verlust an Lungenvolumen (Muller et al. 1987; Staples et al. 1987).

Die Sensitivität des HRCT in der Diagnostik der IPF wird mit 88% angegeben, besonders milde Verläufe können unerkannt bleiben (Orens et al. 1995). Auch im HRCT fallen besonders die bilateralen, vorwiegend basal bzw. subpleural betonten, retikulären Muster auf, ebenso können Traktionsbronchiektasien vorkommen und auch das Muster einer Honigwabenlunge mit charakteristischen subpleuralen Zysten ist häufig zu diagnostizieren (Akira et al. 1993; Austin et al. 1996). Eine Milchglasverschattung liegt gewöhnlich als Ausdruck eines interstiellen Entzündungsprozesses vor (Kazerooni et al. 1997; Remy-Jardin et al. 1993). Reaktiv vergrößerte Lymphknoten im Mediastinum weisen auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin (Fritscher-Ravens et al. 2000).

In über 50% der Fälle, in denen Verdacht auf eine IPF besteht, kann eine sichere Diagnose anhand des Vorliegens typischer klinischer und im HRCT nachgewiesener radiologischer Charakteristika gestellt werden, ohne dass eine Lungenbiopsie nötig ist (Raghu et al. 1993). Dabei korrelieren die im HRCT detektierbaren Veränderungen stark mit der histologisch nachweisbaren Fibrosierung (Kazerooni et al. 1997). Zu beachten ist hingegen, dass im HRCT lediglich 10% des Parenchyms abgebildet werden können (Beigelman-Aubry et al. 2005).

Diagnose	Verlauf	Histologische Befunde	Ort der Manifestation	Radiologische Befunde
IPF/UIP	Chronisch	Zeitliche Heterogenität Fibroblastennester Fibrotisches und normales Lungengewebe	Basilar, peripher	Fibrose Honigwabengewebe
NSIP	Subakut	Interstitielle Entzündung	Basilar, peripher	Milchglasverschattung +/- Fibrose
RB-ILD	Subakut	Alveolarmakrophagen im Interstitium, kleine Bronchien	Oberlappen Bronchozentrisch	Bronchiektasen Milchglasverschattung
DIP	Subakut	Alveolarmakrophagen in den Bronchien	Basilar, peripher Alveolar	Milchglasverschattung Konsolidierung
COP	Subakut	Granulationsgewebe	Oberlappen Kleine Bronchien, alveolar	Milchglasverschattung Noduli Konsolidierung
AIP	Akut	Hyaline Membranen Fibroproliferation	Diffus	Milchglasverschattung Konsolidierung

Tab. 2: Überblick über Charakteristika der verschiedenen ILD in den bildgebenden Verfahren (Strollo 2003)

Die verschiedenen bildmorphologischen Charakteristika haben diagnostische Relevanz (s. Tab. 2), erlauben jedoch keine Rückschlüsse auf ihre Ätiologie (Muller/Coiby 1997).

Für die Quantifizierungen der Lungenfibrose existieren einige Ansätze basierend auf einem Algorithmus für HRCT (Zavaletta et al. 2007), neben histologischen Verfahren (Hubner et al. 2008) oder der konfokalen Lasermikroskopie (Taylor et al. 2002).

Die Rolle der transbronchialen Lungenbiopsie besteht im Ausschluss von Sarkoidose, lymphangitischem Karzinom, Infektionen, diffusem alveolärem Lungenschaden oder Langerhans Zell Histiozytose (ATS 2002). Sie ist indiziert, wenn die Veränderungen im HRCT oder die klinischen Symptome atypisch für eine IPF erscheinen (ATS 2002). Hierbei kann in 85% der Fälle sicher entschieden werden, ob eine IPF vorliegt (Hunninghake et al. 2001). Demnach ist bei 15-20 % der Patienten auch nach durchgeführter chirurgischer Lungenbiopsie die Diagnose noch nicht eindeutig bestätigt.

1.2.7 Prognose

Die mediane Überlebenszeit der ILD ab der Diagnosestellung variiert zwischen 2,5-5 Jahren (Mapel et al. 1998; Park et al. 2007). Demnach ist die IPF die aggressivste Form aller ILD (Bjoraker et al. 1998; Demedts et al. 2001; Katzenstein/Fiorelli 1994).

Verschiedene Komplikationen wie die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie und akute Exazerbationen können im Verlauf der Krankheit auftreten und die Prognose verschlechtern. Die Diskussion, ob Lungenfibrose mit einem erhöhten Risiko für Lungentumore einhergeht, verläuft kontrovers (Harris et al. 1998; Nagai et al. 1992), schließlich werden beide Krankheiten durch gemeinsame Risikofaktoren ausgelöst. Allerdings scheint Rauchen bei Patienten mit bereits bestehender IPF das Krebsrisiko zu erhöhen (Park et al. 2001).

1.2.8 Therapie der Lungenfibrose

Die Therapie der IPF ist Gegenstand aktueller Forschung und erfolgt weitgehend symptomatisch. Die konventionellen Therapieansätze der IPF umfassen die Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit Kortikosteroiden (Mapel et al. 1996), Immunsuppressiva bzw. zytotoxischer Medikation wie z.B. Azathioprin oder Cyclophosphamid (Johnson et al. 1989), sowie antifibrotische Wirkstoffe wie Colchizin und D –Penicillamine (Peters et al. 1993; Walter et al. 2006). Nach Lage der bisherigen Studien zeigen jedoch nur 10-30% der Patienten eine objektivierbare Verbesserung unter der Therapie mit Kortikosteroiden, 40% der Behandelten gaben eine subjektive Linderung an (ATS 2000). Zu den Therapiestandards gehört ebenso die Sauerstofftherapie sowie die pulmonale Rehabilitation und Atemtraining. Eine letzte Therapieoption bei ausgewählten Patienten stellt die Lungentransplantation dar (ASTP/ATS/ERS/ISHLT 1998). Die Prognose transplantiertter Patienten bleibt allerdings weiterhin ernüchternd, so liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei etwa 50-60% (ATS 2000).

Aufgrund dieser noch nicht ausreichenden Therapiemöglichkeiten ist es notwendig, weitere mögliche alternative Optionen zu erforschen. Interferon γ wurden positive Effekte auf die pulmonale Funktion zugeschrieben, dies konnte allerdings bisher nicht bestätigt werden

(Prasse et al. 2003). Gleiches gilt für den Rezeptorblocker Bosentan (Gunther et al. 2007). Untersuchungen der Bleomycin induzierten Lungenfibrose zeigen auch Wirksamkeit des Angiogenese inhibierenden Thalidomid (Tabata et al. 2007) bzw. des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Aono et al. 2005; Daniels et al. 2004; Vuorinen et al. 2007; Li et al. 2009). Am Tiermodell erwies weiterhin die Inhalation von Heparin- oder Urokinaseaerosol präventive Effekte (Gunther et al. 2003). Zur Diskussion stehen weiterhin der therapeutische Nutzen von Inhibitoren der Zytokine oder Proteasen sowie Antioxidantien, Antikörpern oder Gentherapie.

1.3 Das Lungenemphysem

1.3.1 Einführung

Das Emphysem ist definiert als eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales der Lunge eines Erwachsenen, hervorgerufen durch eine Destruktion der Wandstruktur ohne das Vorliegen einer Fibrose (Thurlbeck/Muller 1994). Histologisches Charakteristikum ist die Zerstörung der Alveolarwände (Taraseviciene-Stewart L/ Voelkel 2008). Morphologisch lassen sich verschiedene Varianten des Lungenemphysems beobachten (s. Abb. 4). Das proximal azinäre bzw. zentrilobuläre Emphysem betrifft die apikal, peripheren Lungenabschnitte, denn es geht von den Bronchioli respiratorii aus und ist die typische Manifestation des Emphysems bei Rauchern. Der Typ des panazinären bzw. panlobulären Emphysems tritt bei Patienten mit Alpha 1 Antitrypsinmangel auf und befällt diffus den Azinus der basalen Abschnitte (Seeger/Matthys 2008).

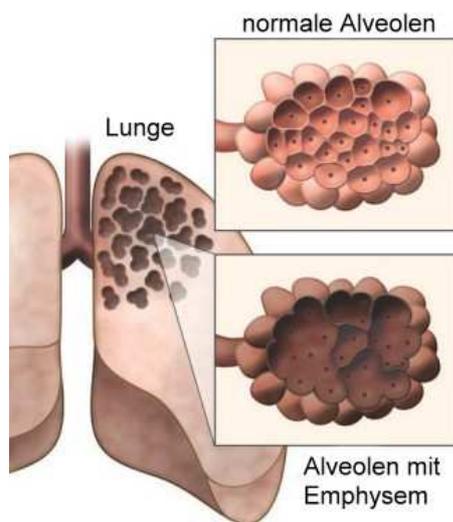


Abb. 4: Darstellung der normalen versus der emphysematösen Alveolen.

(Nach Taraseviciene-Stewart/Voelkel 2008, mit Genehmigung des Autors)

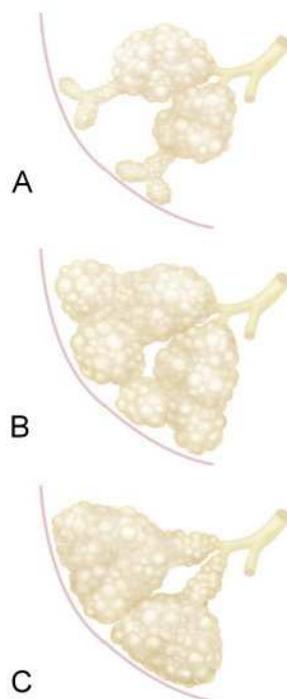


Abb. 5: Morphologische Varianten des Lungenemphysems.

A Zentrilobulär/azinär

B Panlobular

C Paraseptal

(Aus Takahashi et al. 2008, mit Genehmigung des Autors)

Das paraseptale Lungenemphysem ist lokalisiert an der Grenze zur Pleura visceralis der Lungenoberlappen und in Bereichen um die Interlobularsepten. Große, scharf begrenzte Blasen kennzeichnen das bullöse Lungenemphysem und können das benachbarte Gewebe komprimieren.

1.3.2 Epidemiologie

Bei ca. 10% aller Obduktionen aus Kliniken ist die Erkrankung nachweisbar, dabei stellt sie in 2-5% eine wesentliche Todesursache dar (Herold et al. 2008). In den Vereinigten Staaten von Amerika ist das Emphysem aktuell die viert häufigste Todesursache mit 14 Millionen Betroffenen (Irion et al. 2007). Das Emphysem entwickelt sich meist zwischen dem 45. und dem 60. Lebensjahr bei Rauchern in Verbindung mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und tritt doppelt so häufig bei Männern auf (Taraseviciene-Stewart/Voelke 2008; Minai et al. 2008). Allerdings ist auch das Auftreten der Symptomatik ohne Raucheranamnese beschrieben wie etwa bei HIV-1 Infektionen (Diaz et al. 1992; Sahebajami 1992). Ebenso ist bekannt, dass der hereditäre Alpha 1 Antitrypsinmangel eine genetische Ursache darstellt (Hersh et al. 2008).

1.3.3 Klinik

Die Patienten berichten über eine quälende Dyspnoe, die mit Progredienz der Erkrankung bei bereits milder Belastung auftreten kann. Ein ebenfalls häufiges Symptom ist Husten mit Auswurf. Tritt die Erkrankung im Rahmen einer COPD auf, erweitert sich das Spektrum der auftretenden Symptome. Neben pulmonaler Manifestation, wie der Entwicklung einer obstruktiven Ventilationsstörung, einer Bronchiolitis und der Destruktion des alveolären Lungenparenchyms (Finkelstein et al. 1995) finden sich auch die extrapulmonalen Befunde einer Muskelatrophie, Osteoporose, oder Anämie (Cote et al. 2007; Engelen et al. 1999; Sabit et al. 2007). Bei bereits fortgeschrittenem Krankheitsstadium lassen sich manche Patienten in zwei klinische Typen einteilen, den so genannten „Pink Puffer“ und den „Blue Bloater“. Ein Pneumothorax stellt eine Komplikation des Emphysems dar, der durch die Ruptur großer peripherer Bullae entstehen kann (Aribas et al. 2001).

1.3.4 Ätiologie und Pathogenese

Das Lungenemphysem ist eine chronisch obstruktive, meist fortschreitende, progressiv destruierende Lungenerkrankung. Hierfür stellen Nikotinkonsum und Luftverschmutzung die wichtigsten Risikofaktoren dar (Taraseviciene-Stewart/Voelkel 2008). Bereits vor 60 Jahren wurde die Theorie entwickelt, dass langjähriges Rauchen die Hauptursache für die Entwicklung eines Lungenemphysems bedeutet (Symposium of Emphysema 1959; Fletcher/Peto 1977).

Mittlerweile ist Konsens, dass die Lungenstruktur durch inhalierte Noxen u.a. aus Zigarettenrauch, Dieselabgasen, Cadmium oder Mikropartikeln in verschmutzter Luft angegriffen und zerstört wird (Warren 2007; Lindgren et al. 2009). Neben diesen Umweltfaktoren sind auch diverse genetische Ursachen bekannt, die mit einem Emphysem einhergehen, insbesondere der Alpha 1 Antitrypsin Mangel oder angeborene Bindegewebserkrankungen wie Cutis Laxa, Osteogenesis imperfecta oder das Marfan Syndrom (Irion et al. 2007; Corbett et al. 1994). Auch ein intravenöser Drogenmissbrauch oder Cannabiskonsum wird als Auslöser diskutiert (Weisbrod et al. 1993; Beshay et al. 2007).

Ähnlich wie für die Lungenfibrose sind für die Untersuchung des Emphysems verschiedene Tiermodelle bekannt: die Blockade des VEGF Rezeptors durch den Thyrosinkinase-Inhibitor SU5416, außerdem durch Methylprednisolon, welches die Matrix-Metalloproteinase 9 aktiviert und schließlich durch Antikörper gegen Endothelzellen (Voelkel/Taraseviciene-Stewart 2005).

Ein Konzept der Pathogenese beruft sich auf eine entzündungsbedingte Imbalance zwischen Proteasen und Antiproteasen, die einen alveolären Schaden hervorruft. Die inhalativen Noxen stören progressiv die Intaktheit der Alveolen und verursachen variabel ausgeprägte Entzündungsprozesse, welche direkt durch die Noxen oder indirekt durch oxidativen Stress oder die Schädigung des Alveolarepithels hervorgerufen werden. Nach einer Latenzzeit von 30 bis 40 Jahren treten bei empfindlichen Individuen molekulare und zelluläre Prozesse, wie etwa die Imbalance von Proteasen und Antiproteasen, Vorgänge von Apoptose und oxidativem Stress auf. Dem gegenüber stehen Reparations- und Abwehrprozesse.

Weiterhin könnte auch der Zigarettenrauch mit seinen über 5.000 toxischen Bestandteilen direkt einen Epithelschaden auslösen (Tuder et al. 2006), schließlich verursacht Rauchen den typischen, histologisch nachweisbaren Verlust der Septen und eine Vergrößerung der Lufträume. Die Histologie einer viralen bzw. bakteriellen Entzündung sieht hingegen anders aus.

Eine weitere Hypothese stützt sich auf die Organveränderung aufgrund eines vorgezogenen Alterungsprozesses (Tuder et al. 2006). Kirkwood beschrieb ein Konzept, bei dem der Alterungsprozess früher als gewöhnlich eintritt, hervorgerufen durch eine vorausgegangene Schädigung und den darauf folgenden Reparaturmechanismus (Kirkwood 2005). Hierbei akkumulieren Stress oder Umgebungsfaktoren zu einer molekularen Schädigung, wodurch sich wahllos zelluläre Defekte entwickeln können, was wiederum zu einer erhöhten Fragilität gegenüber Alterungsprozessen, Funktionsverlusten und Krankheiten führen kann. Die ebenso entstandene Entzündungsreaktion kann eine vorbestehende Schädigung noch zusätzlich verschlimmern.

Die Pathologie der COPD, die mit einem Lungenemphysem einhergeht, ist begründet auf entzündungsbedingten Veränderungen der kleinen Bronchien und den daraus resultierenden Verlust von Alveolarsepten und kleinen Gefäßen (Taraseviciene-Stewart/Voelkel 2008). In den Septen lassen sich Infiltrationen von neutrophilen Granulozyten, CD68 positiven Makrophagen sowie Lymphozyten nachweisen (Taraseviciene-Stewart/Voelkel 2008). Das Auftreten von Lymphfollikeln im Lungengewebe oder das Vorhandensein von dendritischen Zellen bzw. Th1-Lymphozyten geben Hinweise auf ein Immungeschehen (Hogg et al. 2004). Ein Modell beschreibt die Pathogenese des enzymatischen Abbaus der Alveolarsepten (Taraseviciene-Stewart/Voelkel 2008). Die durch äußere Noxen aktivierten Makrophagen synthetisieren neutrophile Elastase oder Matrix Metalloproteinase-12, welche das Elastin der Lungenmatrix abbauen. Die Elastinfragmente wirken selbst chemotaktisch (Houghton et al. 2006), so dass die Entzündung weiter aufrecht erhalten wird. Proteolytische Enzyme zerstören Endothel- und Epithelzellen, was in einer Erweiterung der Lufträume resultiert.

Weitere Ansätze diskutieren das Emphysem als eine Autoimmunerkrankung (Taraseviciene-Stewart et al. 2006; Voelkel/Taraseviciene-Stewart 2005).

1.3.5 Diagnostik

Auffällig bei der Inspektion ist ein fassförmig konfigurierter Thorax. Viele Patienten setzen bereits bei Inspiration und Expiration die axilläre Atemhilfs- bzw. abdominelle Muskulatur ein. Der hierdurch entstehende intrathorakale Unterdruck führt bei der Atmung zu Hauteinziehungen zwischen den Rippen. Ebenso lässt sich ein paradoxes Atemmuster mit gegenläufigen Exkursionen von Thorax und Abdomen beobachten.

Bei der körperlichen Untersuchung ist in der Thoraxperkussion ein hypersonorer Klopfeschall, tiefstehende, gering verschiebliche Lungengrenzen und ein vermindertes bis fehlendes Atemgeräusch in der Auskultation dominierender Befund. Liegt begleitend eine Bronchitis vor, lassen sich Giemen, Pfeifen oder Rasselgeräusche auskultieren.

Mittels konventionellem Thoraxröntgenbild können nur mittelschwere oder schwere Formen des Lungenemphysems diagnostiziert werden. Die Sensitivität der Untersuchung ist noch nicht ausreichend und wird mit 41 (Thurlbeck/Simon 1978) - 80% (Sanders 1991) in der Literatur angegeben. Im Röntgenthorax deutet ein abgeflachtes, tiefstehendes Zwerchfell und vergrößerte Rippenabstände auf eine Lungenüberblähung hin (Friedman 2008). Im Seitenbild imponiert ein vergrößerter retrosternaler Raum. Weiterhin ist der antero-posteriore Thoraxdurchmesser erhöht. Die Transparenz des Organs scheint besonders in bullösen Arealen ver-

mehrt zu sein, hingegen sind die Lungengefäße vermindert (Irion et al. 2007). Die für manche Emphysemformen typischen Bullae haben einen Durchmesser von über einem Zentimeter.

Die hochauflösende Computertomographie ist heute die zuverlässigste Methode, ein Lungenemphysem zu diagnostizieren und seine Ausprägung und Verteilung zu studieren (Thurlbeck/Muller 1994). Die Sensitivität, insbesondere in hochauflösender Technik bei einer Schnittdicke von etwa 1–2 mm beträgt über 90% (Sanders 1991). Dabei lässt sich eine ausgezeichnete Korrelation zwischen radiologischer Quantifizierung des Emphysems und morphometrischen Untersuchungen am resezierten Gewebe nachweisen (Sanders 1991).

Im Computertomogramm sind besonders die zu geringen Verschattungen, das Auftreten von Bullae und eine Rarefizierung der Gefäße charakteristisch (Irion et al. 2007). Anhand der Verteilung der Veränderungen kann auf den Typ des Emphysems geschlossen werden:

Emphysem	Panlobulär	Zentrilobulär	Paraseptal
Lokalisation	Im unteren Lungendrittel	Begrenzt, im oberen Lungendrittel, medullär mit Abstand zur Pleura	Subpleural oder peribronchovakulär
Aussehen	Uniforme Areale sehr geringer Dichte	Multifokale, kleine Areale geringer Dichte ohne sichtbare Bewandung in der Umgebung zu normalem Gewebe	Areale geringer Dichte mit definierter, haardünn bis prominenter Bewandung (Pseudozysten)
Charakteristika	Gefäßrarefizierung und -distorsionen	Konfluenz bei Progression	Sägezahnartiges Muster

Tab. 3: Eigenschaften der unterschiedlichen Emphysemtypen im HRCT (Irion et al. 2007)

Quantifizierungen sind mit Hilfe der CT Untersuchung ebenfalls durchführbar. Bergin et al. benutzten 1986 einen subjektiven Score von 1-4, um den prozentualen Anteil des betroffenen Lungparenchyms zu beschreiben (Bergin et al. 1986).

Die „Density Mask“ ist ein in den kommerziell erhältlichen Geräten enthaltenes, standardisiertes Software Programm, welches als objektives, reproduzierbares, semiautomatisches Messverfahren die Quantifizierung eines Emphysems anhand der unterschiedlichen Dichtewerte erlaubt (Kinsella et al. 1990). Dabei werden nur die Bereiche mit Hounsfield-Einheiten zwischen -910 bis -1000 HU berücksichtigt, weil diese in den veränderten Bereichen pathologisch erhöht sind (Hayhurst et al. 1984).

In den meisten Fällen wird das Emphysem anhand von Ergebnissen aus Anamnese, Klinik, dem Röntgenthorax und den Lungenfunktionstests diagnostiziert (Thurlbeck/Muller 1994).

Durch eine Erhöhung der TLC, des RV bzw. des RV/TLC-Quotienten lässt sich die charakteristische Überblähung spirometrisch nachweisen. Diese ist dynamisch, d.h. sie nimmt bei Steigerung der Ventilation zu. Die COPD, bei der das Emphysem einen Teilaspekt bildet, basiert auf einer reversiblen Bronchialobstruktion mit verminderter FEV1/FVC (Seegeer/Matthys 2008).

Die Fluss-Volumen-Kurve dokumentiert eine bronchiale Obstruktion, die vor allem in der Expiration ausgeprägt ist. Die verminderte Diffusionskapazität bringt die Reduktion der Gasaustauschoberfläche zum Ausdruck. Unter Belastung kommt es in der arteriellen Blutgasanalyse zum Absinken des PO₂. Einige Patienten zeigen signifikante Veränderungen der spirometrischen Parameter nach der Verwendung eines Bronchodilatators (Eden et al. 1997).

Die COPD wird nach den GOLD Kriterien anhand der FEV1/FVC in 4 Schweregrade eingeteilt (Rabe et al 2007).

1.3.6 Prognose

Die Prognose wird durch die respiratorische Funktion bestimmt. Der BODE Index hat sich bei der COPD als geeigneter Marker herausgestellt, um die Mortalität vorherzusagen und einen Krankheitsprogress zu erkennen (Cote/Celli 2009). Dabei stellt die FEV1 jedoch den besten isolierten Vorhersagewert für das Überleben dar (Minai et al. 2008).

Die genetisch bedingten Emphysemtypen haben eine schlechtere Prognose. Unter den in der North-American AAT Registry eingetragenen Betroffenen betrug die 5-Jahres Mortalität 19%, wobei in 72% die Todesursache durch eine respiratorische Insuffizienz bedingt war im Gegensatz zu 10% der Todesfälle durch Leberzirrhose (The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group 1998). Mit einer FEV1 unter 20% des Normwertes beträgt die 2 Jahresmortalität 40%, wenn keine Lungentransplantation erfolgt (Seersholm et al. 1994).

Die COPD wird auch in der Zukunft ein ernstes, weltweites Gesundheitsproblem darstellen, so wird geschätzt, dass 2020 die COPD die dritthäufigste Todesursache sein wird (Murray/Lopez 1997).

1.3.7 Therapie

Die symptomatische Behandlung mit Bronchodilatoren (Anticholinergika, Beta-Agonisten, Phosphodiesterase-Inhibitoren) kann die Lungenfunktion der Emphysempatienten gering verbessern (Diaz et al. 2008). Die Beendigung des Rauchens ist in jedem Stadium sinnvoll.

Die COPD wird darüber hinaus mit inhalativen Bronchodilatoren und inhalativen Glukokortikoiden behandelt. Ab dem Schweregrad 4 ist zudem eine Langzeitsauerstoffbehandlung indiziert (Rabe et al. 2007). Eine spezielle pulmonale Rehabilitation und Atemtraining verbes-

sern die Lebensqualität und sind in das Therapieprogramm der COPD fest integriert (Ries et al 2008).

Die ATS/ERS empfiehlt zur Behandlung der Lungenmanifestation des Alpha1 Antitrypsin Mangels die intravenöse Ersatztherapie mit Alpha-1-Antitrypsin oder synthetischen Elastase Inhibitoren bei Pi ZZ Patienten mit einer FEV1 zwischen 35- 65% (ATS 2003). Dieses kann sowohl aus humanem Plasma fraktioniert oder rekombinant hergestellt und inhalativ aufgenommen werden (Sandhaus 2004). Eine Gentherapie ist zurzeit Gegenstand aktueller Forschung.

Bei ausgewählten Patienten kann durch eine Volumenreduktionsoperation eine Palliation der quälenden Dyspnoe erzielt werden (Criner/Sternberg 2008). Die Verbesserungen der FEV1 nach der Operation werden in verschiedenen Studien mit 27 bis 61% ausgewiesen, wobei das Maximum nach 6 Monaten postoperativ erreicht wird und sich nach 2 bis 3 Jahren wieder weiter verschlechtert (De Camp et al. 2008; Cohen 2004).

Für fortgeschrittene Erkrankungen im Endstadium kann eine Organtransplantation der letzte Ausweg sein. Die Emphysemerkrankung stellt mit einem Anteil von 40-55% die Hauptindikation für eine Lungentransplantation (Christie et al. 2009).

1.4 Die Micro-Computertomographie

Die Micro-CT ist ein bildgebendes Verfahren zur Erzeugung von isotropen 3 dimensional Datensätzen und in seinem Aufbau grundsätzlich mit den klinischen Computertomographen vergleichbar.

Im Jahre 1981 konstruierte Feldkamp einen CT-Scanner, der eine Microfokusröntgenquelle, eine Videokamera sowie einen fluoreszierenden Screen enthielt (Ritman 2004). Zusammen mit Davis und unter Einbeziehung eines modifizierten fächerstrahlgeometrischen Rekonstruktionsalgorithmus von Herman entwickelte er 1989 die Kegelstrahlgeometrie (Feldkamp 1989). Dieser Scanner arbeitete mit einer Auflösung von 70 μm . Glüer beschrieb 1989 ein Gerät mit Parallelstrahlgeometrie und Synchrotronstrahlung, dieser besaß Photodioden als Detektor und hatte eine Auflösung von 50 μm (Glüer et a. 1989). Kinney arbeitete 1994 mit einem Scanner mit 20 μm Auflösung, dessen Detektor aus einem charge-coupled device System (CCD-Array) bestand (Kinney et al. 1994). 1996 entwickelte Ruegsegger ein kommerziell verfügbares Gerät mit Fächerstrahlgeometrie, Mikrofokusröhre, CCD-Detektor und einer Auflösung von 20 μm (Ruegsegger et al. 1996). Im Laufe der Zeit zeigte sich eine Entwicklung des Micro-CTs zur Präferenz der Kegelstrahlgeometrie, was die Scanzeit verkürzt, je-

doch einen technisch höheren Aufwand beinhaltet, da ein Flächendetektor anstelle eines Zeilendetektors einen wesentlich komplizierteren Rekonstruktionsalgorithmus benötigt.

Nach der Entwicklung der ersten Micro-CT Scanner begann die Forschung zunächst an Knochengewebe, das aufgrund seiner durch Mineralisation bedingten hohen Röntgendichte sowie der klar definierten, stabilen Struktur ideale Voraussetzungen bietet und keiner verstärkenden Kontrastierung oder speziellen Fixierung bedarf (Feldkamp et al. 1989). Es dauerte nicht lange, bis sich diese vielversprechende Technik auch auf die Darstellung und Quantifizierung von Weichgewebe anwenden ließ. Heute hat sich die Micro-CT als wichtige Technik zur Darstellung und Quantifizierung von nahezu allen Organen und Gewebearten von Mensch und Tier etabliert (de Crespigny et al. 2008; Fredin et al. 2008; Nordsletten et al. 2008; Ortiz et al. 2000; Clementino-Luedemann et al. 2006; Bentley et al. 2007; Botter et al. 2006; Wang et al. 2007; Waarsing et al. 2005; Martin-Badosa et al. 2003). Besondere Schwerpunkte liegen in der Beurteilung und Quantifizierung von Gefäßen und ihrer Pathologien (Wintermark et al. 2008) sowie Vasa vasorum (Langheinrich et al. 2007) und Angiogenese (Duvall et al. 2004). Auch die Verbesserung der Methodik beschäftigte die Wissenschaft weiterhin, z.B., wenn es um die Qualität des gewählten Kontrastmittels ging (Langheinrich et al. 2008).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Wie zuvor dargestellt, wird die Computertomographie bereits zur Quantifizierung und Darstellung der Lungenfibrose und des Lungenemphysems auch im klinischen Alltag eingesetzt (Zavaletta et al. 2007; Coxson et al. 1997; Gamsu et al. 1995; Rodriguez et al. 1995). Mit der Microcomputertomographie erfolgte dies bisher nur im Tiermodell der Bleomycin induzierten Lungenfibrose (Cavanaugh et al. 2006), jedoch noch nicht bei Patienten mit IPF.

Microtomographische Untersuchungen zur Quantifizierung des Lungenemphysems beim Menschen gibt es bereits. Dabei konnten erste Betrachtungen zur Darstellung der Alveolen (Watz et al. 2005) bzw. Messungen der terminalen Bronchien bei COPD Patienten zusammengetragen werden (Hogg et al. 2009), die eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen und Quantifizierungen bilden.

Eine quantitative Analyse von Gefäßen, Parenchym und lufthaltigem Raum an humanen Lungen mit idiopathischer pulmonaler Fibrose in Kombination mit einer dreidimensionalen Darstellung ist bislang in keiner der internationalen Studien durchgeführt worden. Ebenso liegt keine Arbeit über quantitative Messungen und Darstellung des humanen Lungenemphysems mit Synchrotronstrahlung vor.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- 1.) Sind mit Hilfe der Microtomographie Veränderungen von Parenchym und Gefäßen in fibrotischem bzw. emphysematösem humanen Lungengewebe nachweisbar?
- 2.) Lassen sich diese Veränderungen quantifizieren bzw. in der dreidimensionalen Darstellung visualisieren?
- 3.) Welchen Einfluss haben verschiedene Fixierungsverfahren auf die Darstellung im Micro-CT?

2. Material und Methoden

2.1 Technische Grundlagen der Micro-Computertomographie

Die Computertomographie ist eine röntgenbasierte Technik zur Aquisition überlagerungsfreier Schnittbilder. Dabei erfolgen in Einzelschritten die Aquisition, die Rekonstruktion, die Visualisierung und zuletzt die Quantifizierung der Datensätze.

Im Unterschied zu klinischen Computertomographen enthalten Micro-CT Systeme eine Mikrofokusröntgenröhre oder eine Synchrotronstrahlungsquelle, während konventionelle Röntgenröhren auf Grund ihrer zu hohen Fokusgröße nicht verwendet werden. Dies ermöglicht die Erzielung von sehr kleinen Fokusgrößen von 5-30 μm , wobei sich im Vergleich zu den klinisch genutzten Ganzkörper-Spiral-CT Scannern die lokale Bildauflösung von 0,5-1mm auf 5-50 μm steigern lässt. Die Wahl der eingebauten Strahlenquelle bestimmt im Wesentlichen die Strahlengeometrie des Scanners: Kegel- oder Fächerstrahlung wird durch den Einsatz einer Mikrofokusröhre erzielt, während Synchrotronstrahlung eine Parallelstrahlgeometrie erzeugt (s. Abb. 6). Ebenso beeinflusst die Wahl der Strahlenquelle die maximal erreichbare Auflösung des Scanners. Diese ist bei Microfocussystemen von der Fokusgröße der Röntgenröhre abhängig, hingegen bei Synchrotronstrahlern vom Auflösungsvermögen des Detektors.

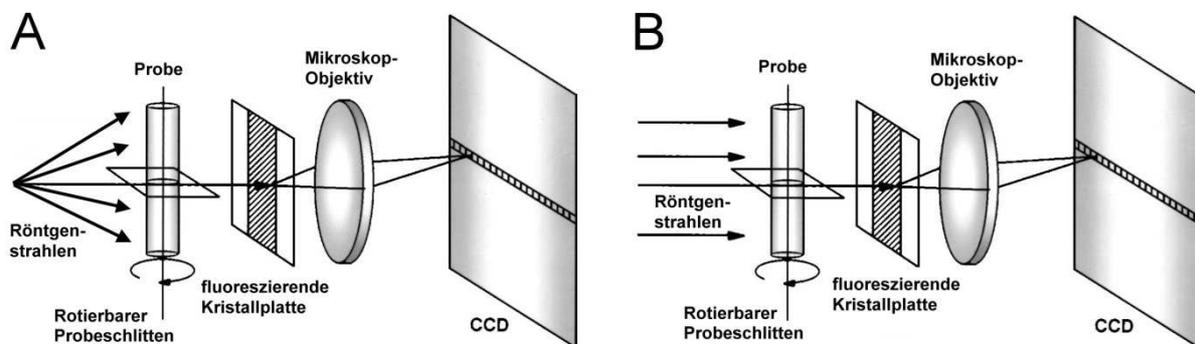


Abb. 6: Aufbau des Micro-CT

Der Aufbau eines Micro-CT Scanners setzt sich zusammen aus einer Strahlenquelle in Kegelstrahlgeometrie (A) oder Parallelstrahlgeometrie (B), der CCD-Detektorkamera sowie dem Probeschlitten.

Nach Jorgensen et al. 1998.

Die Mikrofokusröhre erzeugt Röntgenquanten, welche parallel bzw. kegelförmig fokussiert auf die Probe treffen, wodurch die Photonenflussdichte abgeschwächt auf den Detektor trifft (Photoeffekt). Dort erfolgt die Umwandlung der Röntgenstrahlung in sichtbares Licht und weiterhin in ein digitales Signal. Die erhaltenen Daten eines Intensitätsprofils liefern letztlich ein digitales Transmissionsradiogramm des Objekts. Durch Rotieren der Probe nach den eingestellten Winkelschritten entstehen mehrere Absorptionsbilder, die mit Hilfe eines speziellen

Algorithmus, einer Rückprojektionstechnik, in isotrope, axiale Schnittbilder umwandelbar sind. Der Dichte jedes Voxels wird ein Grauwert zugeordnet. Der angeschlossene Computer ermöglicht die Steuerung der Anlagen und dient der Datenerfassung.

Das in dieser Studie verwendete SkyScan-1072 System besitzt eine Szintillatorschicht mit einer Dicke von ca. 25 μm als Röntgendetektor. Dieser liegt auf dem Kamerafenster einer gekühlten CCD-Kamera (12 bit) mit 1024×1024 Pixeln und ermöglicht einen maximalen Bildausschnitt von 25 mm.

Der computergesteuerte Probeschleifen kann in frei definierten Winkelschritten rotiert und variabel vertikal in dem Strahlengang zwischen Röntgenquelle und Detektor positioniert werden. Durch die Verkleinerung des Abstandes zwischen Objekt und Strahlenquelle lässt sich bei Kegelstrahlung eine Vergrößerung erzielen, so dass Proben bis zu einer Größe von 20 mm im Durchmesser gescannt werden können. Die maximale Fokusgröße von 8 μm limitiert jedoch den Vergrößerungsfaktor, da bei minimalem Abstand der Probe zur Röntgenröhre durch die Unschärfe des Projektionsbildes auf dem CCD-Detektor zunimmt. Die maximale geometrische Auflösung des Projektionsbildes und der daraus errechneten Querschnittsbilder beträgt somit 1/1000 des Objektdurchmessers. Die tatsächliche Auflösung nimmt daher in dem Maße ab, in dem die Vergrößerung durch Annäherung der Probe an die Röntgenröhre gesteigert wird.

Darüber hinaus hat auch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Röntgenquanten Einfluss auf die Auflösung: Bei einer isotropen Erhöhung der Auflösung um den Faktor 10 benötigt man bei gleichbleibendem Probendurchmesser eine um 10000 höhere Quantenzahl (Engelke et al. 1999). Verkleinert man die Fokusgröße, mit dem Ziel eine höhere Auflösung zu erreichen, wird simultan die Röhrenleistung reduziert. Dies begründet, weshalb ein möglichst kleiner Focus bei gleichzeitiger Intensitätssteigerung nicht erzielt werden kann. Daher werden in der Micro-CT Proben mit kleinem Durchmesser verwendet, wobei die Messzeiten im Minuten- bis Stundenbereich liegen.

Vergleicht man das in der medizinischen Forschung etablierte Micro-CT mit einem klinisch genutzten CT Scanner, stehen die bereits oben genannten Unterschiede der lokalen Bildauflösung im Vordergrund. Die besondere geometrische Anordnung bei Feldkamps Kegelstrahlentechnologie ermöglicht eine direkte dreidimensionale Rekonstruktion, während im klinischen CT Scanner zunächst nur zweidimensionale Schichtungen kombiniert werden. Während dort die Röntgenquelle um den Patienten rotiert, geschieht dies im Micro-CT mit der auf dem Schlitten fixierten Probe. Ebenso ist man nicht auf das Drehzentrum einer rotierenden Quell-Detektor-Kombination festgelegt.

2.2 Die Synchrotronstrahlung

Die Besonderheit der Synchrotronstrahlung liegt darin, dass aus dem kontinuierlichen Spektrum der Röntgenstrahlen ein monochromatischer Strahl einer Frequenz herausgefiltert wird, dessen Intensität um den Faktor 10^6 höher ist als in einer konventionellen Röntgenröhre (Bonse/Busch 1996). Die Vorteile der Synchrotronstrahlung sind daher die besseren Auflösungs- werte ($<5 \mu\text{m}$) sowie die kürzere Untersuchungszeit und die Vermeidung von Artefakten. Die aufwändige Technik zeigt jedoch einen vergleichsweise höheren experimentellen und finanzi- ellen Aufwand, entstehend durch die Ortsgebundenheit und die begrenzte Verfügbarkeit der benötigten Elektronenspeicherringe.

Als Synchrotronstrahlung bezeichnet man die beim Betrieb von Kreisbeschleunigern und Speicherringen auftretende intensive elektromagnetische Strahlung, wenn geladene Teilchen mit relativer Geschwindigkeit eine radiale Beschleunigung erfahren. Die elektrisch geladenen Teilchen erlangen in ringförmigen Beschleunigern nahezu Lichtgeschwindigkeit und fliegen, gehalten durch elektromagnetische Wechselfelder aus Ablenkmagneten, auf einer Kreisbahn, entlang derer sich radialstrahlig angeordnete Messplätze befinden. Die Elektronen besitzen eine gemeinsame Flugrichtung und lassen sich tangential zur Kreisbahn abzapfen wobei sich der Strahl somit bequem in langen Vakuumrohren zum Experimentaufbau führen lässt. Die Strahlenintensität ist abhängig von der Energie der kreisenden Teilchen sowie vom Radius des Beschleunigers, der die Bahnkrümmung bestimmt.

Diese Eigenschaften ermöglichen einen breit gefächerten Einsatz der Synchrotronstrahlung. 2009 wurde eine Studie an murinem Lungengewebe unter der Verwendung von Synchrotron- strahlung durchgeführt (Yong et al. 2009). Ebenso konnte die Rekonstruktion eines humanen Azinus an Lungengewebe nach Synchrotronscan erfolgen (Litzlbauer et al. 2010).

Die fünf Lungenemphysemproben sowie sechs Kontrollproben wurden am NSLS in Brook- haven, USA, gescannt. Das NSLS ist ein Synchrotron zweiter Generation, welches mit einer Elektronenenergie von 2.8 GeV betrieben wird. Der maximale Ringstrom ist ca. 280 mA, und die mittlere Lebensdauer der Elektronen im Ring beträgt ca. 20 Stunden.

2.3 Herkunft, Gewinnung und Bearbeitung der Gewebeproben

2.3.1 Übersicht über die Proben

In diese Studie wurden insgesamt 56 humane Lungenproben von 14 Patienten einbezogen. Davon stammen 24 aus Resektionsoperationen oder Autopsien von Patienten mit IFP gegen- über 22 Gewebeproben als Kontrolle. Weiterhin wurden 10 Proben von einem Patienten mit zentrilobularem Lungenemphysem untersucht. Ihre Gewinnung und Bearbeitung erfolgte im

Pathologischen Institut der Universitätsklinik Gießen (2003) und im Institut für diagnostische Pathologie der Universität Homburg/Saar (2008). Die Proben wurden vor der histologischen Aufarbeitung durch das pathologische Institut für diagnostische Zwecke der Abteilung für Radiologie zur Verfügung gestellt. Unmittelbar nach der Micro-CT Untersuchung wurden die Proben vollständig dem Institut für Pathologie überstellt.

Um die dünnen Alveolarwände in der microtomographischen Untersuchungen in bester Qualität darstellen zu können, wurden verschiedene Kontrastierungsmethoden angewandt, da die Septen an sich einen sehr niedrigen Röntgenkontrast besitzen. In der Literatur findet sich noch keine einheitliche Stellungnahme, welche Methodik die geeignetste ist. Aus diesen Gründen kamen verschiedene Kontrastierungsverfahren zur Verwendung: Eine native Formalinfixierung ohne Kontrastverstärkung, die Behandlung mit Osmiumtetroxid, Quecksilberchlorid und dem intravasalen Kontrastmittel Microfil zur Gefäßdarstellung.

In der Kontrollgruppe für die Messung von Alveolarräumen und Lufträumen wurden 3 Autopsieproben von 3 Lungengesunden verwendet, die Einteilung zur Fibrosegruppe erfolgte durch den histologisch bestätigten Nachweis der IPF.

Bei der Gefäßquantifizierung erfolgte die Zuordnung ebenfalls nach der Histologie. Hierdurch ist es bei dieser Messung bedingt, dass verschiedene Proben dreier Patienten in verschiedene Kategorien einbezogen wurden, je nach dem Vorhandensein von Fibrose. Eine genaue Aufschlüsselung der Proben und ihrer verschiedenen Kontrastierungen findet sich im Anhang.

Zu beachten ist weiterhin, dass wir 2 verschiedene Strahlenquellen benutzten. Da bei einem Emphysem eine Rarefizierung der feinen Alveolarsepten vorliegt, wurden die Emphysemproben, sowie ihre Kontrollen mit Synchrotronstrahlung gescannt, um eine bessere Auflösung zu garantieren. Bei Fibrose liegt im Gegensatz eine Verdickung des Parenchyms vor, weshalb diese Proben sowie ihre Kontrollen mit Röntgenstrahlung gescannt wurden. Proben, welche aufgrund von Kontrastmittelfehlperfusion nicht für Messungen verwendbar waren, wurden nicht miteinbezogen.

2.3.2 Fixierung der Lungenproben

Die Fixierung der Proben in Inspirationsstellung erfolgte analog der von Rau und Mittermeier 1980 entwickelten Formalindampfbeatmung (Rau et al. 1980a; Rau et. al 1980b). Hierbei wird zunächst ein Hauptbronchus über ein Ansatzstück mit der Beatmungsmaschine konnektiert. Das Organ platziert man auf einer anatomisch geformten Fläche der Fixationskammer, sodass Spülflüssigkeit und Blut aus dem Bronchialsystem ablaufen können. Beim Erwärmen des Formalins (*Formaldehyd 37 %, säurefrei; Firma Merck, Darmstadt*) auf 50°C entsteht in

dem geschlossenen Behälter Formalindampf, welchen eine Membranpumpe gleichmäßig über die Bronchien in das Gewebe transportiert. Um auch die äußere, pleurale Oberfläche der Lunge entsprechend zu fixieren, wird zudem Formalindampf über ein Schlauchsystem in die Fixationskammer eingeleitet. Zu beachten ist dabei, dass die Temperatur des Dampfes in der Kammer durch eine zwischengeschaltete Heizung um etwa 5°C höher ist, als in der Lunge, damit kein Kondenswasser entsteht. Anschließend erfolgt eine volumenkontrollierte Beatmung mit positivem endexpiratorischem Druck. Der Beatmungsdruck wurde mit Hilfe eines nachgeschalteten Ventils individuell reguliert. In der Inspirationsphase transportiert die Pumpe ein konstantes Volumen des Gasgemisches aus Luft und Formalindampf. Durch den folgenden Stillstand der Pumptätigkeit ermöglichen die natürlichen Rückstellkräfte die Retraktion der Lunge. Schließlich wird manuell das zugeführte Volumen durch Erhöhung des nachgeschalteten Widerstands bis zur optimalen Entfaltung gesteigert. Entnommen werden kann eine belüftete, in Inspirationsstellung fixierte Lunge. Das feuchte Gewebe wurde ebenfalls mit dem unter 2.4.3.2 beschriebenen Critical Point Dryer (*CPD 030, Firma BAL-TEC, Witten*) getrocknet, wodurch sich überschüssige Flüssigkeit entfernen ließ, ohne eine Deformation des Gewebes zu erzeugen.

Beatmungsspitzenndruck	max. 35 cm H ₂ O
Atemfrequenz	12 / Minute
PEEP	5 cm H ₂ O
Verhältnis Inspiration: Expiration	1:2

Tab. 4: Übersicht der Beatmungsparameter

2.3.3 Präparation der mit Osmiumtetroxid kontrastierten Lungenproben

2.3.3.1 Chemische Entwässerung

Bei einigen Proben wurde zusätzlich eine Kontrastierung mit Osmiumtetroxid in Anschluss an das beschriebene Formalindampfverfahren durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben auf die Osmierung erfolgt durch die chemische Entwässerung. Dabei werden 100 ml DMP (2,2-Dimethoxypropan, Gehalt 97%, Firma Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) mit 4 Tropfen 37 %iger Salzsäure (Firma Merck, Darmstadt) angesäuert. Die Gewebeproben werden noch einmal mit saugfähigen Tüchern behandelt und in frische Behältnisse gebracht, in welche mit einer Glaspipette 7 ml angesäuertes DMP zugegeben wird. Nach 30 minütiger Rotation erfolgt der

erste von 4 Austauschvorgängen des DMP, nach denen sich jeweils die Rotationsphase wiederholt. Nach dem letzten Rotationsschritt wird das DMP noch einmal ausgetauscht.

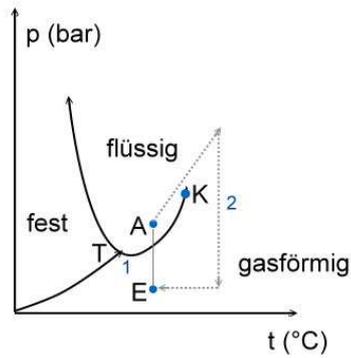
2.3.3.2 Die Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD= *critical point drying*)

Die verwendete Kritisch-Punkt-Trocknung ist ein in der Elektronenmikroskopie etabliertes Verfahren und garantiert eine gewebeschonende Trocknung ohne Veränderung der räumlichen Gewebestruktur (Bray et al. 1993).

Jede Flüssigkeit besitzt einen kritischen Punkt, der durch die kritische Temperatur und den kritischen Druck definiert ist: Am kritischen Punkt existieren bei gleicher Dichte Gas und Flüssigkeit gleichwertig nebeneinander. Die kritische Temperatur ist die größtmögliche Temperatur, bei der die flüssige Phase einer Substanz noch auftreten kann, Temperaturen darüber erlauben nur noch das Auftreten der Gasphase. Hält man die Temperatur oberhalb der Kritischen, so kann man eine Probe durch Druckverminderung trocknen, ohne dass dabei die Phasengrenze Gas-Flüssigkeit durchlaufen wird. Man verwendet für die Kritisch-Punkt-Trocknung biologischer Proben Substanzen wie CO₂ (Kritischer Punkt bei 73 bar und 31°C). Da sich das Wasser im Präparat mit flüssigem CO₂ nur schlecht mischt, wird es zunächst durch ein Zwischenmedium (2,2-Dimethoxypropan) substituiert, das mit dem Objektwasser zu Aceton und Methanol reagiert.

Im Anschluss an die chemische Entwässerung ermöglichen weitere Waschvorgänge den schrittweisen Austausch des DMP gegen CO₂. Dieses liegt bei Raumtemperatur und einem Druck von 55 bar in flüssiger Form vor. Der Critical Point Dryer CPD 030 besitzt einen verschließbaren Probenhalter, gefüllt mit angesäuertem DMP, worin die Stanzzylinder nicht in Kontakt mit Luft kommen. Gleiches gilt für die Druckkammer, in welche der Halter eingesetzt werden kann. Diese wird fest verschlossen auf 10°C gekühlt und die Einleitung des CO₂ (*Kohlendioxid, unter Druck verflüssigt; Firma Messer-Griesheim, Kassel*) kann beginnen. Ein Magnetrührer durchmischt ca. 4 Minuten lang das Gasgemisch, welches hierauf wieder abgeleitet wird. Dieser Prozess wird insgesamt 11 Mal durchgeführt, bis die Proben vollständig von flüssigem CO₂ umspült werden. Die Druckerhöhung erfolgt mit dem Temperaturanstieg, bei >31°C findet ein plötzlicher Wechsel des Aggregatzustandes statt, das vorher flüssige CO₂ wird abrupt gasförmig, wodurch die Proben getrocknet werden. Um Feuchtigkeitseffekte bei der durch das Ablassen des Gases bedingten Abkühlung zu verhindern, wird die Druckkammer weiter bis auf 42°C erwärmt. Unter diesen Bedingungen wird kontrolliert Gas bis zur Erreichung des Normaldruckes abgelassen.

Abb. 7: Phasendiagramm

K Kritischer Punkt**A** Ausgangszustand**E** Endzustand**T** Tripelpunkt**1** Luft-/Vakuumtrocknung**2** Kritisch-Punkt Trocknung

2.3.3.3 Osmierung

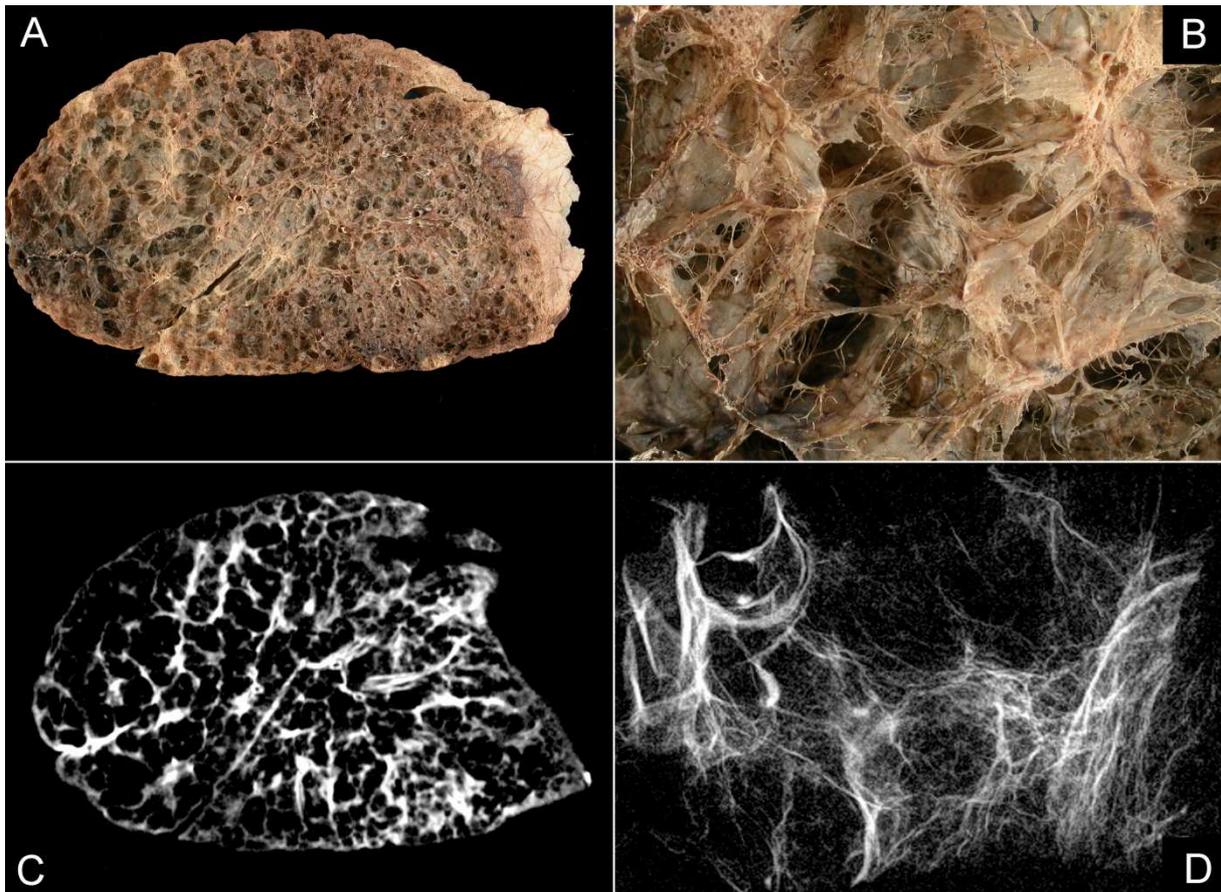


Abb. 8: Makroskopische Ansicht der emphysematösen Lungenprobe und Radiographie

A Übersichtsaufnahme nach Formalindampffixierung**B** 5-fache Vergrößerung der Probe aus A**C** Radiographie der emphysematösen Lungenprobe**D** Radiographie eines Teilvolumens von C

Die Proben werden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gefüllt, in welches daraufhin 1,5 ml einer 15%-igen Osmiumtetroxid Lösung (*Osmiumtetroxid kristallin, Firma Paesel-Lorei; Frankfurt/Main; gelöst in Reinstwasser*) pipettiert werden. Diese Arbeiten werden unter einem Abzug durchgeführt da sich Osmiumtetroxid als sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken oder

Berühren mit der Haut erweist. Während der nun folgenden etwa dreistündigen Rotation auf einem Probenrotator (*Eigenbau G. Magdowski; Institut für Anatomie und Zellbiologie*) färbt sich das Gewebe dunkelbraun-schwarz. Im Anschluss entfernt man überschüssige Osmiumlösung durch Auskippen des Reaktionsgefäßes und vorsichtige Betupfung der Proben mit einem saugfähigen Papiertuch. Weitere Rückstände lassen sich durch eine mehrmalige Waschprozedur beseitigen. Dazu gibt man das Gewebe in ein Schraubdeckelgefäß zusammen mit 7 ml Aqua dest. Nach weiteren 30 Minuten auf dem Probenrotator wird die Flüssigkeit im Behälter durch frische ausgetauscht und erneut rotiert. Dieser Vorgang wird drei Mal wiederholt.

2.4 Präparation der intervaskular kontrastierten Lungenproben

Wenn möglich wurde der zum Zielsegment VIII führende Abschnitt der Arteria pulmonalis mit einer Knopfsonde sondiert, sonst wurde ein anderes geeignetes Segment für die Perfusion ausgewählt.

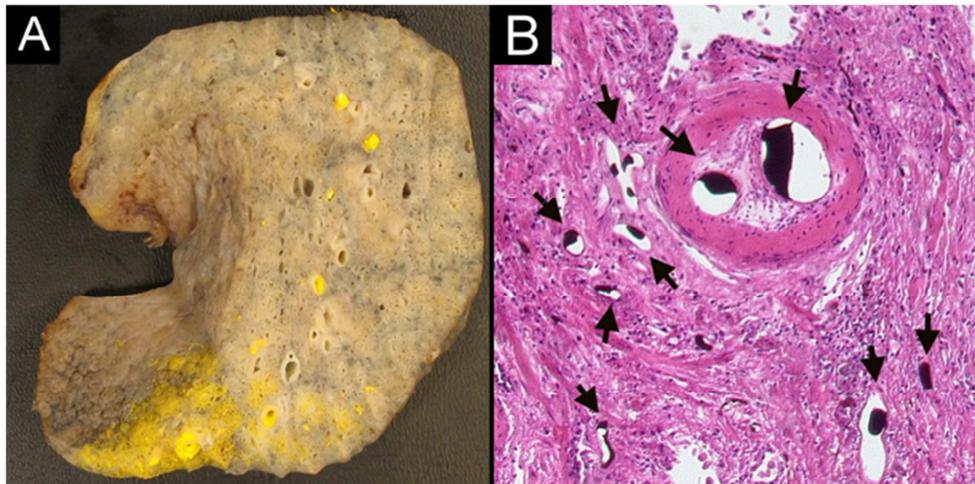


Abb. 9: Intervaskular kontrastierte Proben

A Schnitt durch den rechten Unterlappen. Deutlich erkennbar ist die Anreicherung des gelb gefärbten Kontrastmittels Microfil in den Gefäßen des Lungensegmentes VIII. Auch makroskopisch sind die starke Fibrosierung und der Verlust an normalem, alveolärem Gewebe sichtbar.

B Histologischer Schnitt durch die fibrotische Probe, 10fache Vergrößerung HE Färbung, das Microfil Kontrastmittel ist als schwarze Ablagerung in den Gefäßen sichtbar (Pfeil), durch die histologische Bearbeitung kam es teilweise zu Schrumpfungsartefakten. Auffällig ist zudem das reorganisierte, revaskularisierte, doppelumige Gefäß. Diese typische Morphologie kann das Residuum einer Thrombosierung sein.

Entlang der Knopfsonde wurde ein blockbarer Ballonkatheter (Cuffdurchmesser 6,0 mm) bis in die Peripherie des Segmentes vorgeschoben. Darüber wurde langsam isotone 0,9%ige Kochsalzlösung appliziert, bis der Ausfluss makroskopisch blutleer erschien. Als Kontrastmittel verwendeten wir das bleihaltige Verbundpolymer Microfil® (*Microfil® MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA*), ein Gemisch aus drei Komponenten: Dem gelben MV Compound,

dem MV Diluent und dem MV Curing Agent, der Aushärteflüssigkeit. Diese Komponenten wurden im Verhältnis 4:5:0,45 in ein Gefäß gegeben und bei 900 Umdrehungen/Minute mit Hilfe eines Magnetrührers 10 Minuten gründlich durchmischt. Anschließend wurde das Kontrastmittel unter Verwendung einer Spritze über den Katheter in die Arterie mit einem nominalen Druck von etwa 30mmHg appliziert. Die korrekte Perfusion wurde an der Gelbfärbung des Segmentes ersichtlich, die sich aus der Füllung der Gefäße mit dem gelben Kontrastmittel ergab.

Durch die Zugabe des Curing Agents zu den beiden anderen Komponenten wurde der Aushärtungsvorgang gestartet und das flüssige Kontrastmittelgemisch nahm innerhalb von 20 Minuten durch Polymerisation eine gummiartige Konsistenz an. Nach dieser Zeit konnte der Katheter entfernt werden und mit der Fixierung des Lungenpräparates fortgefahren werden. Hierzu wurde das Bronchialsystem mit 4%iger Formalinlösung gefüllt und in Formalinlösung liegend über Nacht fixiert.

2.4.1 Präparation der HgCl₂ kontrastierten Lungenproben

2 Gewebeproben eines Patienten mit IPF wurden mit Bouinscher Lösung bearbeitet. Sie wurden dabei dreimal getränkt über Röhrchen, welche mit Bouinscher Lösung gefüllt waren. Für die Bouin-5-Stammlösung wurden 12 g Quecksilber-2-chlorid und 2,5 g Na-Acetat in 200ml destilliertem Wasser gelöst. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden jeweils 20 ml der Bouin-5-Stammlösung mit 2 ml 37% Formalinlösung versetzt.

2.5 Erstellung und Färbung der histologischen Schnittpräparate

Nach dem CT Scan wurde Gewebe von allen verwendeten Proben in Paraffin eingebettet und fortlaufend in 8µm dicke Steifen geschnitten. Es wurden Färbungen in Hämatoxylin-Eosin und eine Goldners-Masson-Trichome Färbung durchgeführt. Die Begutachtung, Digitalisierung und Photographie der Proben fanden im Giessener Institut für Pathologie an einem Lichtmikroskop (*Axioskop, Zeiss; Kamera: JVC, KY-F75U*) statt.

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung von Zellen und Zellstrukturen, mit der sich Zellkerne, Knorpelzellen und Kalk blauviolett darstellen und Zytoplasma sowie Muskelzellen rot angefärbt werden (Welsch 2005). Ribosomen und Regionen mit reichem Gehalt an rauhem endoplasmatischem Retikulum im Plasma sind als blauviolett erkennbar. Erythrozyten erscheinen orange, elastische Fasern bleiben ungefärbt bis rosa.

Folgende Reagenzien werden für die Vorbereitung der Proben verwendet: Isopropanol in 100%, 96% und 70%, Aqua Dest und Leitungswasser sowie Xylol. Für den Färbeprozess be-

nötigt man die folgenden Farbstoffe: Eine Gebrauchslösung saures Haemalaun nach Mayer, ebenso wie eine Eosingebrauchslösung, bestehend aus 0,5%igem wässrigem Eosin (*Merk, Darmstadt*) und einer Kombination von 70%igem Alkohol und Eisessig in einem Mischungsverhältnis von 1:1,5 Tropfen.

2.5.2 Goldners-Masson-Trichome Färbung

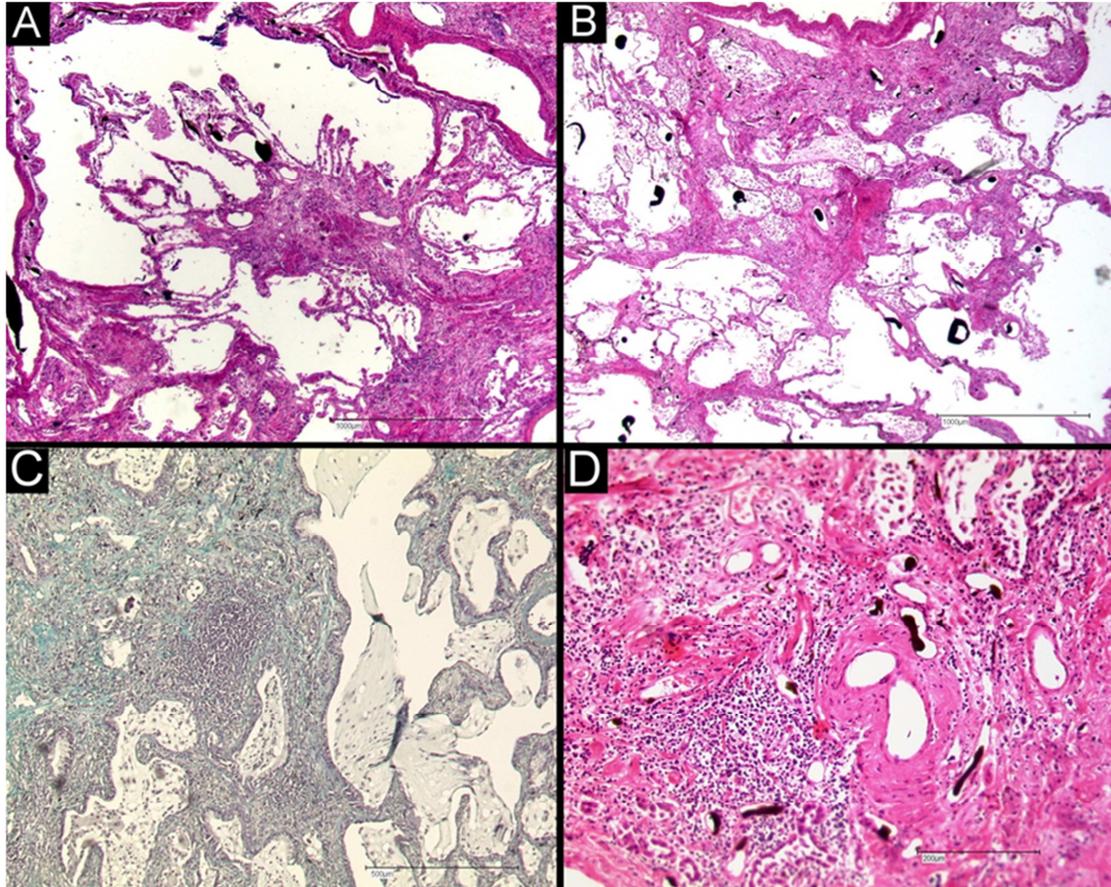


Abb. 10: Histopathologische Abbildungen der verwendeten IPF Proben

-
- A/B* Übersichtsaufnahme zweier Lungen in HE Färbung. Das Kontrastmittel Microfil ist als schwarze Ablagerungen in den Gefäßen sichtbar. Der Eichbalken markiert 1000µm. Erkennbar sind sowohl fibrotische Areale, als auch noch intaktes Lungengewebe.
- C* Probe in Goldners-Masson-Trichome Färbung. Das grün angefärbte Bindegewebe ist stark vermehrt, Fibroblastenfoci sind erkennbar. Der Eichbalken markiert 500µm.
- D* Detailaufnahme einer Probe in HE Färbung. Zu beachten sind Fibroblastenfoci im Gewebe und abgelagertes Kontrastmittel in den Gefäßen. Der Eichbalken markiert 200µm.
-

Mit dieser Färbung lassen sich Zellkerne und Kollagenfasern, besonders gut jedoch die glatten Muskelzellen darstellen (Welsch 2005). Die Zellkerne werden braunschwarz, das Zytoplasma ziegelrot und Kollagenfasern grün angefärbt.

Für die Vorbereitung der Proben verwendet man die folgenden Reagenzien: Isopropanol in 98%, 96%, 90%, 80% und 70%, Aqua Dest und Leitungswasser sowie Xylol. An Stoffen und

Lösungen werden für den Färbeprozess benötigt: Eisenhämatoxylin nach Weigert, Ponceau-Säurefuchsin, Lichtgrün, 1%ige Essigsäure und ein Gebrauchsgemisch von Orange G-Phosphorwolframsäure.

2.6 Scannprozess und digitale Auswertung

2.6.1 Der Scanprozess

Alle Proben wurden in einem kommerziell erhältlichen Micro Computertomographen 1072 der Firma SkyScan (*SkyScan-1072 High resolution desk-top micro-CT system, Firma SkyScan, Aartselaar, Belgien*) gescannt. Das Gerät besitzt eine Wolfram Microfocus Röhre (*80 kV type L6731-01, Firma Hamamatsu, Toyooka-village, Japan*) mit einer Röhrenspannung von 80 kV. Diese kann bei einer Beschleunigungsspannung von 20 – 80 kV bei einer Leistung von 8 W betrieben werden. Das Gerät basiert auf einer Kegelstrahlgeometrie. Die Proben wurden aus der Eppendorfküvette entnommen und in Cellophanfolie, welche das Austrocknen der Probe verhindert, eingeschlossen. Mit Hilfe von Formmasse ließen sie sich auf einem computergesteuerten, rotierbaren Probenschlitten fixieren und über 180 Grad in Einzelschritten von 0,45 bzw 0,225° mit einer Aufnahmezeit von 2,6 Sekunden pro Schritt scannen. Der Detektor enthält eine digitale 12-bit CCD-Kamera mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel. Die geometrische Vergrößerung wird durch den Abstand zwischen dem Untersuchungsobjekt und der Strahlenquelle determiniert und führt zu einer maximal 80-fachen Vergrößerung mit einer minimalen Pixel- bzw. Fokusgröße von 8 µm. Für die Rekonstruktion des Rohdatensatzes wurde ein modifizierter Feldkamp cone-beam Rekonstruktionsmodus eingesetzt. Jedes Bild besteht aus einer Matrix von 1024 x 1024 Pixel mit einer individuellen Voxelgröße von etwa 5- 18 µm³.

Zunächst erfolgte die Aufnahme eines als Scout view bezeichneten Übersichtsradiogrammes bei einer Röhrenspannung von 60 kV und einem Röhrenstrom von 100 µA, woran sich die korrekte Positionierung der verpackten Probe auf dem Schlitten überprüfen ließ und eventuelle Korrekturen vorgenommen werden konnten. Auch die von 0° bis 180° in 20°-Schritten angefertigten Topogramme dienten der Vorbereitung für ein optimales Scanergebnis. Die Expositionszeit wird anhand einer Absorptionskurve im Topogramm ermittelt, wodurch Über- und Unterbelichtungen vermieden werden. Zur Verwendung kam weiterhin ein Algorithmus zur Korrektur von Strahlenaufhärtungen („beam hardening correction“).

Bei einigen Proben war das Probenvolumen zu groß, um in einem einzigen Scan dargestellt zu werden, weshalb bei diesem Gewebe zuerst der untere, danach der obere Anteil gescannt

wurde. Mit Hilfe einer speziellen Software ließen sich beide Scans nahtlos zu einem Gesamtbild zusammenfügen.

Bei einer durchschnittlichen Expositionszeit von 2,6 s und durchschnittlich 800 Einzelbildern ergab sich eine reine Gesamtexpositionszeit von ca. 34 Minuten. Die Dauer der gesamten Scanzeit ist allerdings wesentlich länger, denn zwischen jedem Einzelbild muss eine Abspeicherung der aufgenommenen Rohdaten in Dateien im TIFF-Format erfolgen. Daraus können im Weiteren axiale Schnittbilder rekonstruiert werden, wobei verschiedene Parameter, wie etwa die Grauwertdarstellung, manuell einstellbar sind. Die so bearbeiteten Datensätze bestanden aus bis zu ca. 800 Schnittbildern im Bitmap-Format pro Probe.

Während Röhrenspannung, Aquisitionszeit und Matrixgröße bei allen Proben identisch mit den oben genannten Werten übereinstimmen, variieren die Parameter Voxelgröße und Rotationswinkel individuell zwischen den verschiedenen Proben. Die Proben wurden um 180° gescannt in einzelnen Winkelschritten, welche $0,45^\circ$ oder $0,225^\circ$ betragen. Die Voxelgröße wurde individuell zwischen $3,49 \mu\text{m}^3$ und $18,08 \mu\text{m}^3$ gewählt. Für die Ermittlung der minimal benötigten Voxelgröße, um die Morphologie der kleinen Gefäße zu beurteilen, wurden einige der intervaskulär kontrastierten Proben bei stark erhöhten Voxelgrößen bis $500 \mu\text{m}^3$ gescannt. Um die Lungenfeinarchitektur noch genauer darstellen und studieren zu können, wurden 6 Kontrollproben und 5 Proben mit schwerem Lungenemphysem am NSLS in den Brookhaven National Laboratories mit einem X2B beam-line gescannt. Die Proben wurden um 360° um ihre zentrale Achse rotiert in Schritten von jeweils $0,25^\circ$, was zu 1440 einzelnen Projektionen führte. Die Drehachse wurde anhand der lateralen Begrenzung ausgerichtet. Indem die einzelnen Bilder entlang der Rotationsachse aneinander gefügt wurden, wurden Ansichten aus jedem möglichen Winkel zwischen 0 und 180° erzeugt, was ein effektives Blickfeld von $9,2\text{mm}$ (d.h. 2.300 Pixel zu $4\mu\text{m}^3$) in der transversalen Richtung bzw $5,2\text{mm}$ (1.300 Pixel zu $4 \mu\text{m}^3$) in der axialen Richtung bedeutet. Jedem Pixel wurden Werte einer 16 bit Grau-Skala zugeordnet. Alle Proben wurden unter identischen Bedingungen mit einer nominalen Photonenenergie von 18keV und einer Bandbreite von 50eV gescannt.

2.6.2 Vergleich von histologischen Präparaten und Micro-CT

Nach dem oben genannten Verfahren wurden histologische Schnitte aus den Gewebeproben gefertigt, welche zuvor im Micro-CT gescannt worden sind. Durch die Gegenüberstellung der beiden darstellenden Verfahren sollte die Detailfähigkeit und Realitätstreue der Micro-CT Darstellung im direkten Vergleich zur Histologie anhand derselben Probenschicht erfolgen. Hierfür musste der dreidimensionale Micro-CT Datensatz nach der exakten Schnittebene für

das eindimensionale histologische Bild durchsucht werden (s. Abb. 12). Dazu wurde das Fly-Tool der Analyze Software (*Biomedical Imaging Resource, Mayo Foundation, USA, Version 7.0*) verwendet. Dieses ermöglicht es, den Datensatz nach individuell einstellbaren Schichttiefen in alle möglichen Ebenen des Raumes zu schwenken, drehen oder rotieren. Auffällige Strukturen, wie zum Beispiel große Gefäße, Bronchioli, Septen oder der Probenumriss, dienen zunächst als grobe Landmarken. Waren diese richtig positioniert, erfolgte die Feineinstellung, wobei zu beachten ist, dass die Schichtdicke variiert. Während die Dicke der Histologie ca. $8\mu\text{m}^3$ beträgt, unterliegt der Micro-CT Datensatz anhand der Voxelgröße von $5\text{-}18\mu\text{m}^3$ einer anderen Unterteilung. Ebenso wird aber auch die Detailauflösung durch die gewählte Voxelgröße limitiert.

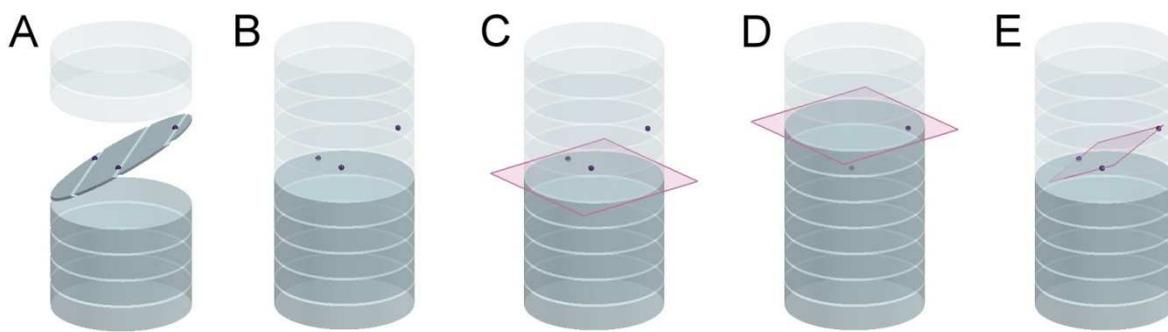


Abb. 11: Schema zum Matching Histologie und Micro-CT Datensatz

- A** Histologische Schnittebene mit drei markanten Landmarken
B Micro-CT Datensatz, durch Voxelgröße in unterschiedliche Schichten aufgeteilt
C/D Micro-CT Datensatz, einzelne Schichten durchfahrbar zum Aufsuchen der Landmarken
E Einstellen der histologischen Schnittebene im Micro-CT Datensatz anhand der Landmarken

2.6.3 Semiautomatische morphometrische Analyse der Mikro-CT Datensätze mit Hilfe der Analyse Software

Zur quantitativen Auswertung wurden die morphometrischen Parameter Gefäß- und Parenchymvolumen sowie des Alveolarraumes gemessen. Hierzu wurden die Werkzeuge „region of interest“ und „Volume render“ des Analyse Softwareprogrammes benutzt. Das Prinzip der Messung beruht auf einem binären System, wobei man anhand der Einstellung des Grauwertes (Treshold) das zu messende Gewebe anhand seiner Dichte auswählen kann. Durch die Binarisierung der Grauwerte werden die ursprünglichen Graustufenbilder in Schwarz-Weiß-Bilder überführt (s. Abb. 13). Die Binarisierung erfolgt mittels eines lokalen Segmentierungsalgorithmus, welcher Gewebe von Nicht-Gewebe anhand von automatisch ermittelten lokalen Schwellenwerten trennen kann. Für die Beurteilung des Gefäßvolumens wurden die Proben mit Microfil Kontrastmittel perfundiert, wodurch eine selektive Darstellung der Gefäße anhand der Dichteanhebung gewährleistet wird. Vor den Messungen wurde mit Hilfe des

„Edit“ Werkzeuges manuell die auf dem Datensatz sichtbare Folie, in welche die Proben eingepackt waren, entfernt. Diese hatte eine ähnliche Dichte wie das Parenchym und wäre mit gemessen worden. Mit Hilfe des „Edit“ Werkzeuges lassen sich manuell ausgewählte Bildanteile markieren, die das Programm daraufhin ausschneidet. Die Markierungen müssen auf jeder neuen Schicht des Datensatzes auf die Richtigkeit ihrer Lage überprüft und ggf. korrigiert werden.

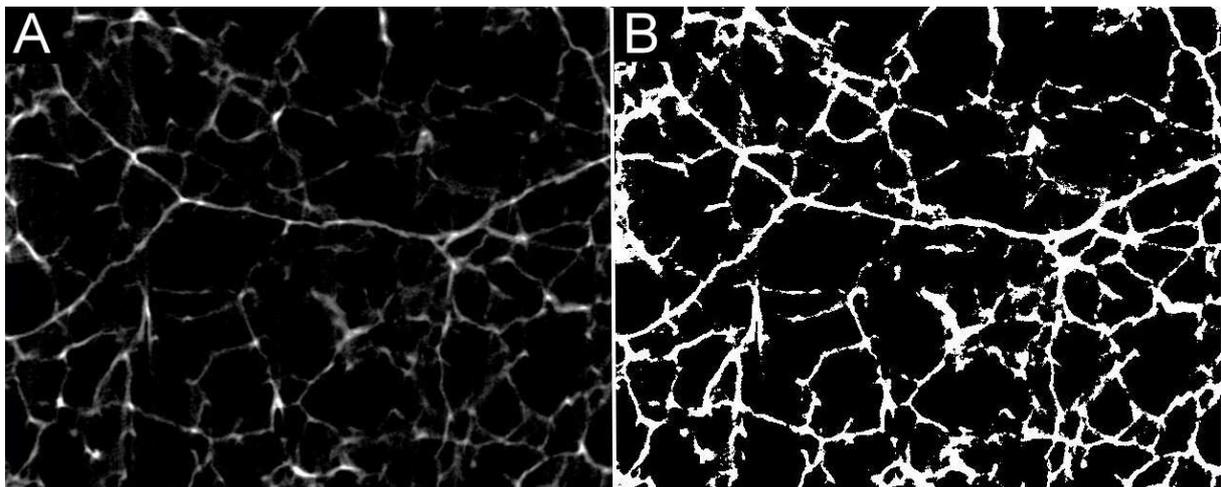


Abb. 12: Binarisierung/ Treshold setzen

A Ausschnitt aus dem Schichtbild des Scans einer Kontrollung

B Bei den binarisierten Bildern wird das Gewebe weiß, die Lufträume hingegen schwarz abgebildet

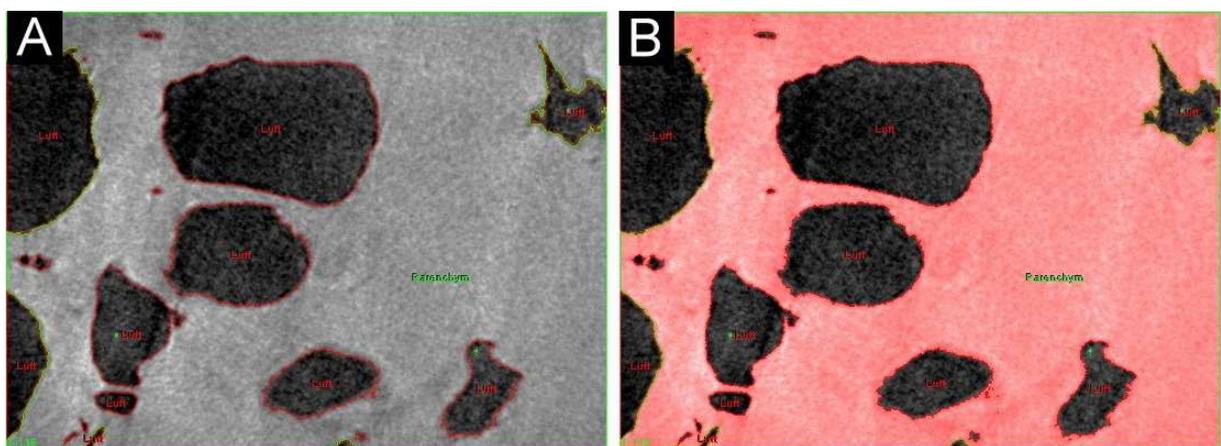


Abb. 13: Quantifizierungsprozess

A Anhand des Tresholds lassen sich die zu messenden, verschiedenen Objekte farbig markieren und benennen, wie hier Alveolarraum (Luft: rot) und Parenchym (grün)

B Während des Quantifizierungsvorganges durch das Analyse Programm werden die momentan gemessenen Objekte (hier Parenchym) farbig hervorgehoben

Die Messung von Alveolarraum und Parenchymanteil erfolgte an den übrigen Proben. Zur Durchführung dieser Messungen wurde jedoch vorher ein kubisches Volumenelement (Region of Interest) ausgewählt und somit ein Untervolumen geschaffen, welches vollständig in-

nerhalb der Probe liegt und keinen Kontakt nach außen besitzt. Dies war nötig, da die im Alveolarraum befindliche Luft die gleichen Dichtewerte hat, wie die die Probe umgebende Außenluft. Aus den gleichen Arealen erfolgte die Bestimmung des Parenchyms.

2.6.4 Zweidimensionale Bildverarbeitung

Ebenso wurde die Funktion „Multiplanar sections“ verwendet. Diese zweidimensionale Reformation dient der schnellen Ansicht des kontinuierlichen Datensatzes und ermöglicht es, einzelne Schichten als Bilddateien zu exportieren. Der Datensatz kann sowohl sagittal, coronar oder axial errechnet werden. Dabei werden aus dem Datenvolumen nur die übereinanderliegenden Voxel einer erstellten Ebene in Längsrichtung des Zylinders dargestellt.

Mit Hilfe des Edit Tools (s. Abb. 15) konnten die störende Folie und ausgeprägte Streustrahlung reduziert werden.

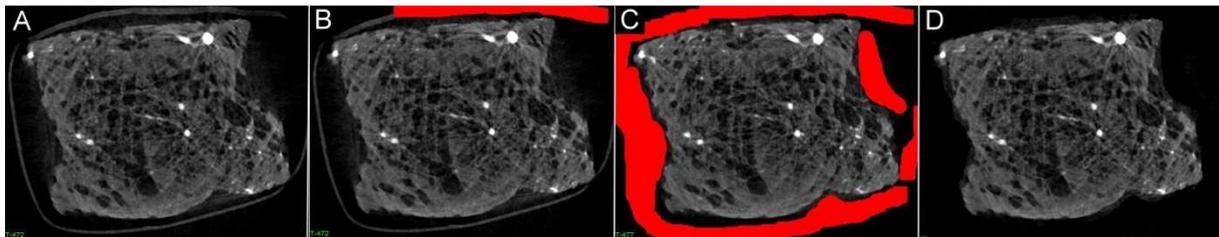


Abb. 14: Edit Tool

A Unbearbeiteter Scan einer fibrotischen Probe

B Mit dem Edit Tool werden die zu entfernenden Elemente manuell in roter Farbe markiert. Um Fehler zu vermeiden muss jede Schicht einzeln bearbeitet werden.

C Sowohl die Einpackungsfolie, als auch die Streustrahlung lassen sich markieren. Jedoch sollte man einen genügenden Abstand zur Probe einhalten.

D Durch die manuelle Bearbeitung konnten die rot eingefärbten Anteile von Folie und Streustrahlung entfernt werden.

2.6.5 Erstellung dreidimensionaler Darstellungen

Die Erstellung der dreidimensionalen Ansichten erfolgte mit dem Werkzeug „Volume render“ des Analyse Programmes. Es vereint Rechenprozesse der Oberflächen- und Volumendarstellung. Hierzu stehen verschiedene Formate zur Auswahl: Die MIP basiert auf einem Transmissions-Algorithmus, welcher die maximale Voxelintensität entlang des Strahlenganges berücksichtigt. Summed Voxel Projection und Surface Projection benutzen ebenfalls einen Transmissions-Algorithmus, die jedoch den Mittelwert der Transmission aller Voxel einbeziehen. Erstere berücksichtigt alle Voxel entlang des Strahlenganges gleich, während letztere den Mittelwert von N Voxel abbildet, beginnend mit denen der Objektoberfläche. Die Funktion des Gradient Shading dient als Standardeinstellung und bezieht das Erscheinungsbild einer reflektierenden Oberfläche bei gleichmäßiger Beleuchtung in die dreidimensionale Erstellung

ein. Das Volume Compositing berücksichtigt zusätzlich auch die farbliche Gestaltung und Transparenz. Der Modus des Depth Shading ist ein Reflektions-Algorithmus, wodurch Voxel im Vordergrund heller gestaltet werden, als dahinterliegende. Demnach ist der Grauwert eines jeden erstellten Pixels abhängig von der Tiefe. Die Helligkeit des Bildes wird durch den dem Betrachter am nächsten liegenden Voxel bestimmt. Die Transparency Einstellung ermöglicht die simultane Abbildung mehrerer Objekte und produziert eine 24 bit True-Color Projektion aller Oberflächengradienten.

Mit Hilfe des Thresholds lassen sich einzelne Bildobjekte selektiv auswählen. Die Funktionen „combine“ oder „seperate“ ermöglichen es, verschiedene Objekte zu kombinieren bzw. ein ausgewähltes Objekt weiter zu unterteilen.

Die verschieden wählbaren Formate mit spezifischen Unterfunktionen erlauben vielfältige Möglichkeiten der Darstellung. Auch Farbgebung, Beleuchtung und die Positionierung im Raum lassen sich vom Benutzer nach seinen Wünschen anpassen. Auf Grund der Größe der Datensätze und der Detailtreue wurden bei der Abbildung des Parenchyms nur einige Schichten der Probe ausgewählt, während Gefäße nur in größeren Volumina in ihrem gesamten Verlauf vollständig wiederzugeben sind.

2.6.6 Rekonstruktion eines Azinus

Bei einer mit Synchrotronstrahlung gescannten emphysematösen sowie einer Kontrolllungenprobe wurde mit dem von Litzlbauer 2010 beschriebenen Centerline-Rekonstruktionsalgorithmus, der auf einem automatischen Baumdiagramm basiert, eine dreidimensionale Rekonstruktion eines humanen Azinus durchgeführt (Litzlbauer 2010).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit dem Analyseprogramm JMP 6.0 durchgeführt. Alle Angaben der deskriptiven Statistik werden als arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des einfaktoriellem Varianzanalysetestes (One-way ANOVA) und des Tukey-Kramer Gegentests ermittelt. Statistische Signifikanz wird für Werte mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollproben

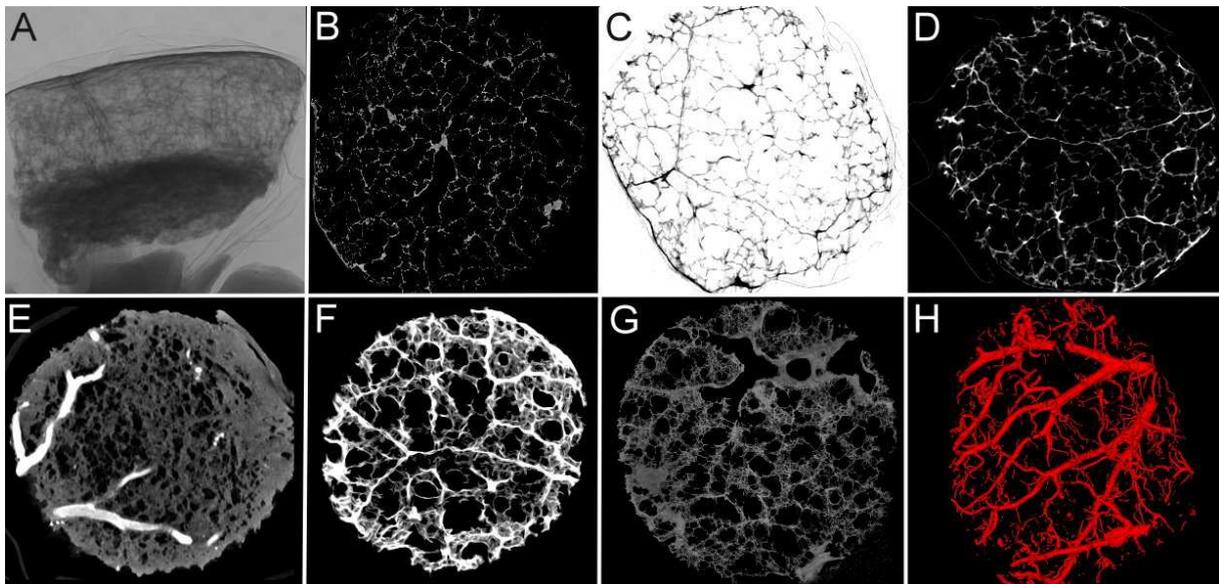


Abb. 15: Übersicht über die Kontrollproben

A Scout view (Übersichtsbild)

B Zweidimensionale Darstellung, Synchrotron

C Zweidimensionale Darstellung, Micro-CT, invertiert

D Zweidimensionale Darstellung, Micro-CT

E Zweidimensionale Darstellung einer intravaskulär kontrastierten Probe, Micro-CT

F Dreidimensionale Darstellung des Parenchyms, Micro-CT

G Dreidimensionale Darstellung des Parenchyms, Synchrotron

H Dreidimensionale Darstellung der Gefäße

Bei den Kontrollproben handelt es sich um aus Autopsien gewonnene Proben, wobei das Lungengewebe an sich keine Pathologien aufweist.

In der Abb. 15 werden verschiedene Ansichten dieser Probengruppe zusammengefasst. Der in **A** dargestellte „Scout view“ dient als Übersicht der zu scannenden Lungenprobe und zur Planung der Micro-CT Untersuchung. Man kann daran einen ersten Eindruck über Positionierung und Qualität der Probe erhalten. Die in **B** und **G** gezeigten Proben wurden im Vergleich zu den anderen mittels der Synchrotronstrahlung gescannt. Unter **C** wird eine invertierte Darstellung gezeigt, wobei durch die Invertierung alle Farb- bzw. Helligkeitswerte eines Bildes umgekehrt werden. Das helle Gewebe kommt auf der nicht invertierten Abbildung mit dunklem Hintergrund besser zur Geltung, während die Alveolarräume auf dem invertierten Bild mit weißem Hintergrund deutlicher ins Auge fallen. **F-H** stellen dreidimensionale Abbildungen der Proben dar, wobei jeweils selektiv das Parenchym oder die Gefäße zur Abbildung kom-

men. Das Analyse Programm bietet durch diverse unterschiedlich einstellbare Parameter eine ganze Bandbreite von Möglichkeiten der dreidimensionalen Darstellung.

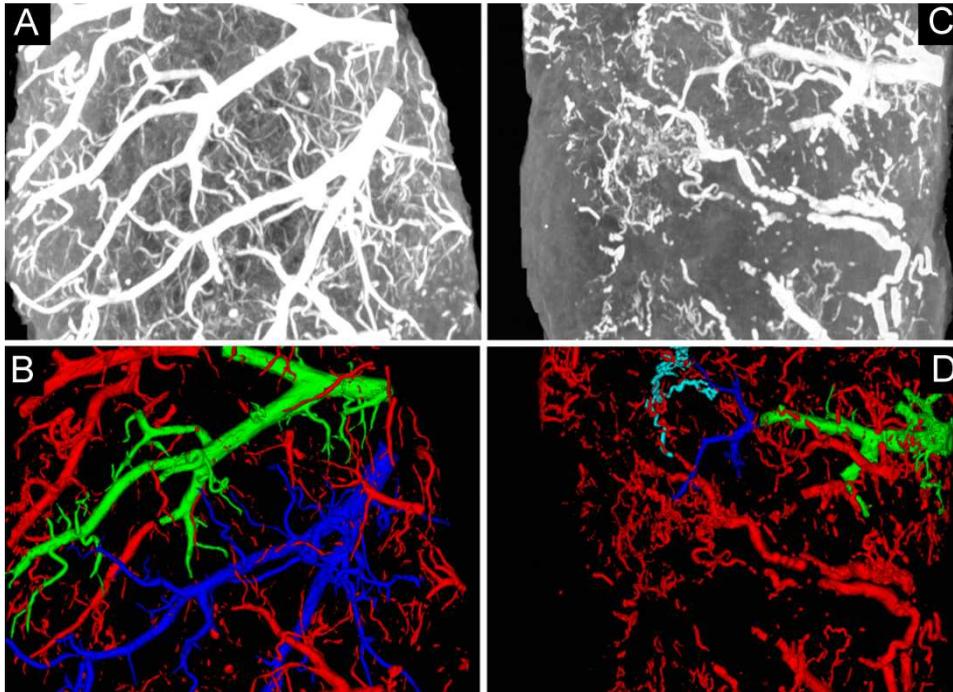


Abb. 16: Vergleich der Gefäßarchitektur von Kontrolllungen und fibrotischen Lungen

-
- A* MIP der Kontrolllung
B Dreidimensionale Gefäßdarstellung der Kontrolllung
C MIP der fibrotischen Lunge
D Dreidimensionale Gefäßdarstellung der fibrotischen Lunge
-

Bei den mit Mikrofil behandelten Proben lässt sich nicht nur eine Quantifizierung des Gefäßvolumens durchführen, sondern die intravaskuläre Kontrastierung ermöglicht auch eine rekonstruktive dreidimensionale Darstellung der Gefäßstruktur. Die Abb. 16 stellt die Ergebnisse der morphologischen Gefäßanalyse von fibrotischen (**C**, **D**) im Vergleich zu gesunden Proben (**A**, **B**) gegenüber. Bei den gesunden Proben fällt die insgesamt bessere Qualität der Gefäßabbildung auf: Die Gefäße sind vollständiger dargestellt und lassen sich gut bis in die Peripherie verfolgen, ihr Verlauf ist geradlinig. Im Vergleich dazu finden sich bei den fibrotischen Proben häufiger Kontrastmittelaussparungen und Gefäßabbrüche und daraus resultierend eine geringere Gefäßdichte. Ebenso zeigen sich häufiger atypische, geschlängelte Gefäßverläufe, wie etwa der hellblaue Gefäßabschnitt in der Abb.16 **D**.

3.2 Fibrose

Die Proben der Fibrosegruppe wurden nach der Fixierung mit Hilfe von unterschiedlichen Verfahren kontrastiert. Die Abb. 17 zeigt in **B-D** eine zweidimensionale Darstellung dieser

verschieden behandelten Proben. In **F** wird wiederum eine dreidimensionale Abbildung des Parenchymanteiles einer fibrotischen Probe visualisiert.

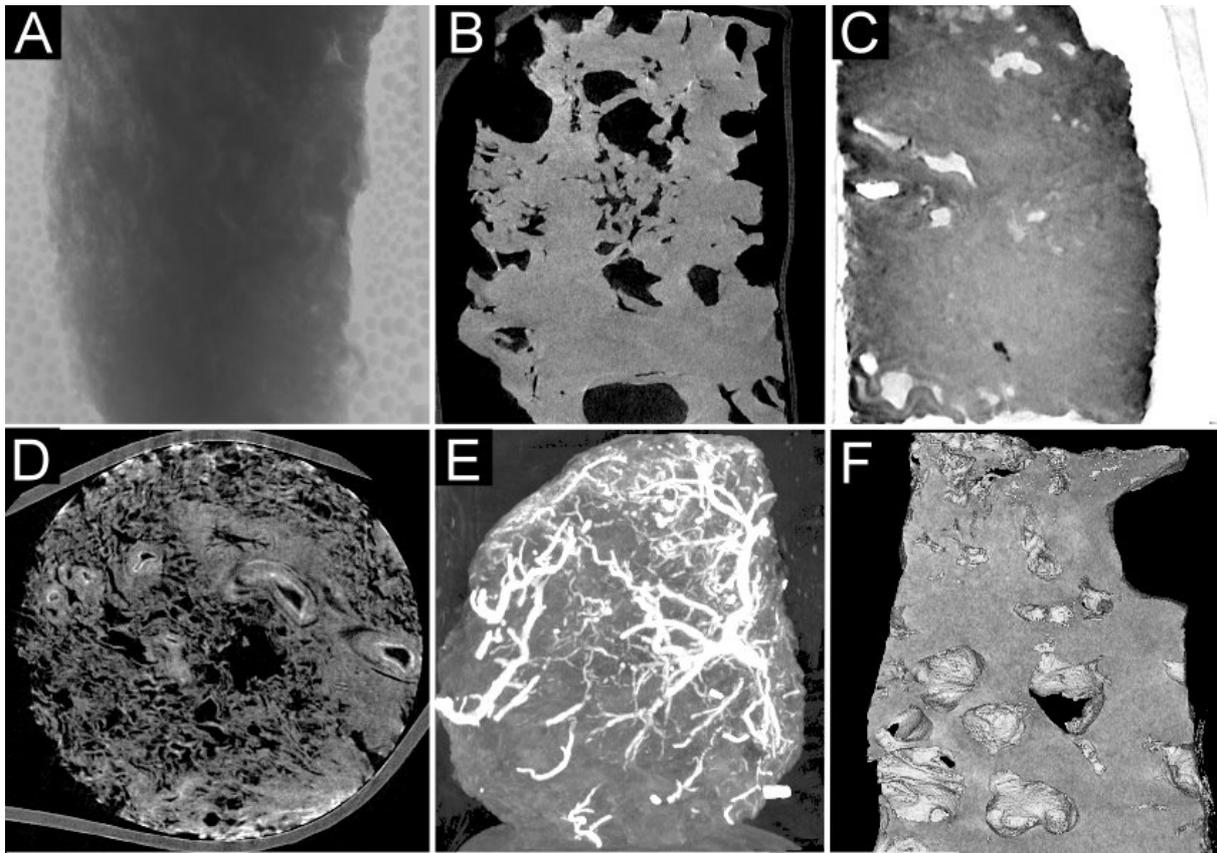


Abb. 17: Übersicht über die Fibroseproben

- A* Scout view (Übersichtsbild)
B Zweidimensionale Darstellung, nativ
C Zweidimensionale Darstellung, Kontrastierung mit Bounin'scher Lösung
D Zweidimensionale Darstellung, Kontrastierung mit Osmiumtetroxid
E MIP mit Darstellung der Gefäße
F Dreidiemnsionale Darstellung des Parenchyms

In Abb. 18 ist eine Auswahl unterschiedlicher Gefäßdarstellungen der intervaskulär kontrastierten, fibrotischen Proben dargestellt. Hieran sollen die morphologischen Auffälligkeiten und Pathologien dieser Probengruppe beschrieben werden. Zum einen existieren Gefäßnetze mit einer Qualität und Ausbreitung ähnlich der Kontrollproben (**A**). Hierbei wirkt die Gefäßdichte sogar leicht vermehrt gegenüber den gesunden Proben. Demgegenüber steht aber eine größere Anzahl von Proben, welche eine Rarefizierung des Gefäßnetzes bzw. atypische Gefäßverläufe oder Gefäßabbruch aufweisen (**B-F**). Bei den Abbildungen **B** und **D** fällt auf, dass besonders der basale Probenanteil eine geringere Gefäßdichte aufweist, bzw. in großen Arealen kein versorgendes Gefäß darstellbar ist. Die mit **C** beschriftete Probendarstellung zeigt eine extreme Rarefizierung der Gefäße aufgrund von zahlreichen Gefäßabbrüchen. Die Pfeile

zeigen auf Kontrastmittelaussparungen in den großen Gefäßen, wobei dahinterliegende Abschnitte wieder kontrastiert sind. Die kleinen Tochtergefäße, die daraus hervorgehen und in die Peripherie ziehen, sind nicht abgebildet. Dies ist auch in der Volume Compositing Projektion derselben Probe zu erkennen. Weitere Pfeile in den Abbildungen **B**, **C**, **D**, **E** und **F** markieren atypische Gefäßverläufe. Dabei kommt es bei mittelgroßen Gefäßen zu einem sonderbar geschlängelten, korkenzieherartig verformten Verlauf. Dies ist häufig bei der Betrachtung der fibrotischen Proben zu finden, jedoch selten bei der Gefäßdarstellung der gesunden.

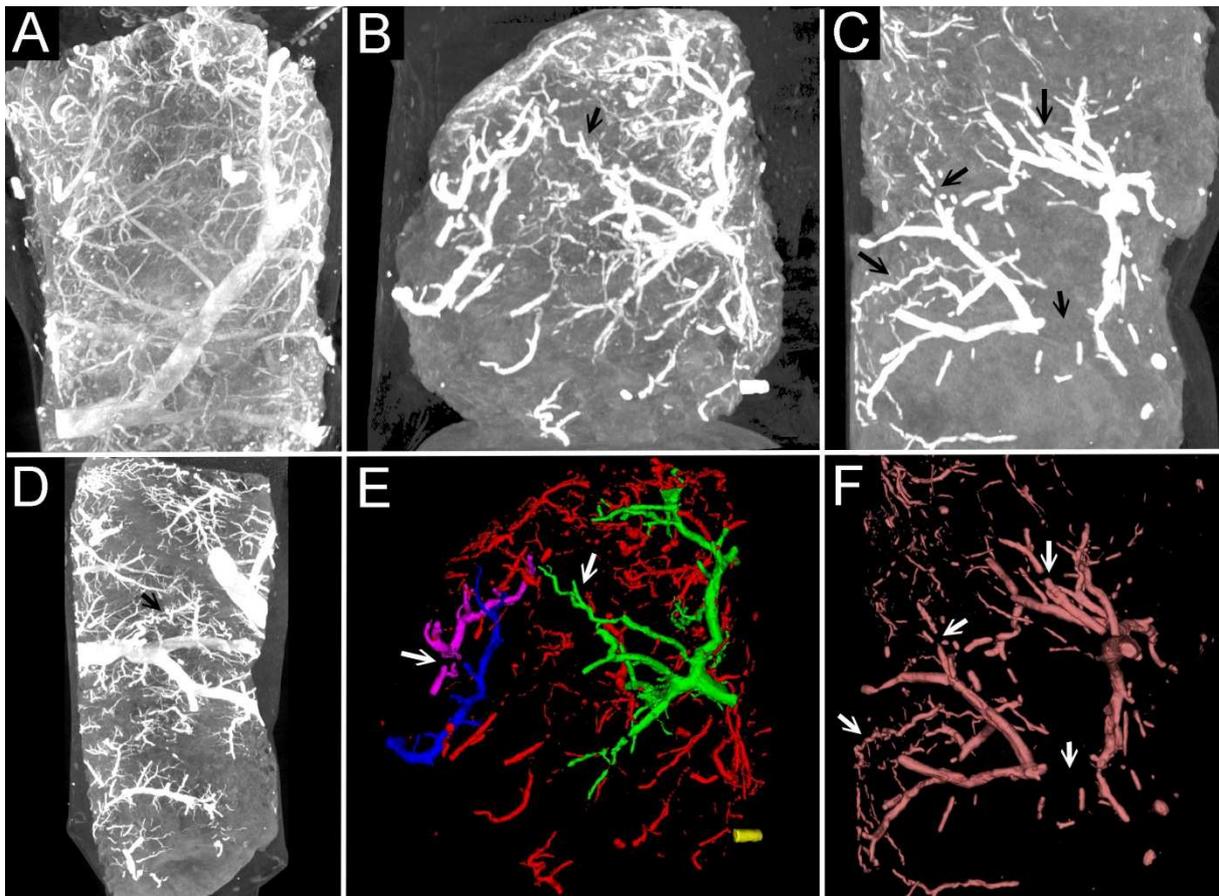


Abb. 18: Gefäßdarstellung der fibrotischen Proben

A MIP einer fibrotischen Probe

B MIP einer fibrotischen Probe

C MIP einer fibrotischen Probe

D MIP einer fibrotischen Probe

E Gradient Shading der Probe aus (B) mit separierten Gefäßen

F Volume Compositing der Probe aus (C)

Die Pfeile markieren geschlängelte Gefäßverläufe und Gefäßabbrüche (s. Text)

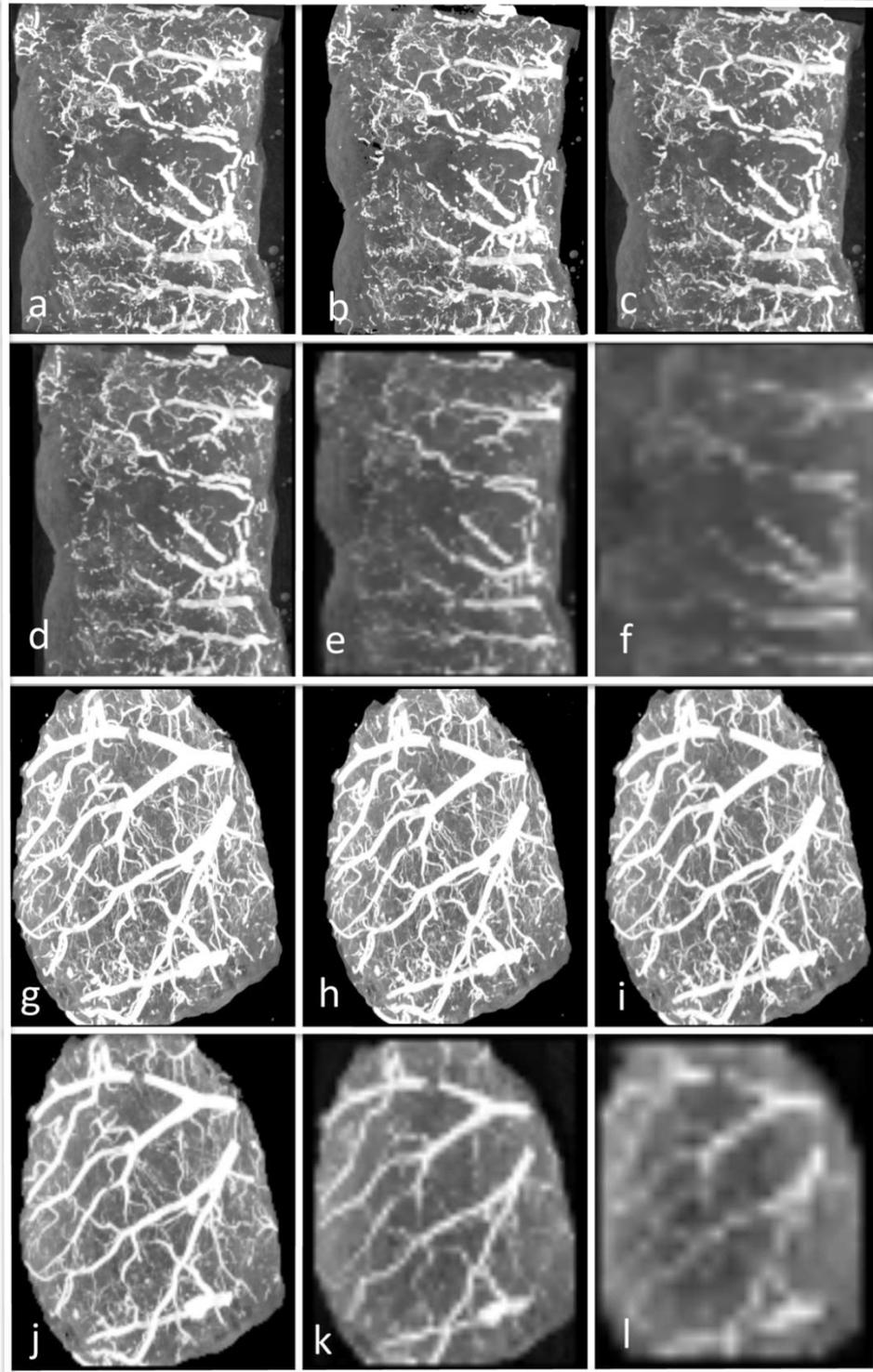


Abb. 19: Gefäßdarstellung nach Voxelgröße

a-f MIP einer fibrotischen Probe mit einer Voxelgröße von 14 μm ; 25 μm ; 50 μm ; 100 μm ; 250 μm ; 500 μm , mit atypischem Gefäßverlauf.

g-l MIP einer Kontrollprobe mit einer Voxelgröße von 14 μm ; 25 μm ; 50 μm ; 100 μm ; 250 μm ; 500 μm , mit physiologischem Gefäßverlauf

Um diese Beobachtungen der aberranten Gefäße in fibrotischen Lungenproben weiter zu untersuchen, wurden 10 der fibrotischen Lungenproben, welche die geschlängelten Gefäßverläufe aufwiesen, sowie die zugehörigen gesunden Kontrollproben mit unauffälliger Gefäßarchitektur in unterschiedlicher Voxelgröße gescannt. Auf diese Weise konnten wir die minimal benötigte Voxelgröße zum Erkennen der Gefäßpathologien ermitteln. Wenn ein klinisches CT zur Detektierung dieses atypischen Teilungs- und Verlaufsmuster bzw. für eine Quantifizierung dieser Gefäße verwendet werden soll, dann ist eine Voxelgröße kleiner als $250\ \mu\text{m}$ (d.h. $0,157\ \text{mm}^3$ Voxelvolumen) zu verwenden. Wie in Abb. 19 ersichtlich, zeigen sich ab $250\ \mu\text{m}$, wenn auch noch leicht verschwommen, erste erkennbare Unterschiede im Gefäßverlauf zwischen den beiden Proben, bei größeren Voxelgrößen lassen sich diese noch nicht ausmachen. Um die Qualität der microtomographischen Abbildungen im Vergleich zu einem etablierten Verfahren, wie der Histologie, zu beurteilen, verglichen wir die zweidimensionalen Schichten einiger gescannter Datensätze mit den vorher angefertigten histologischen Präparaten der identischen fibrotischen Probe.

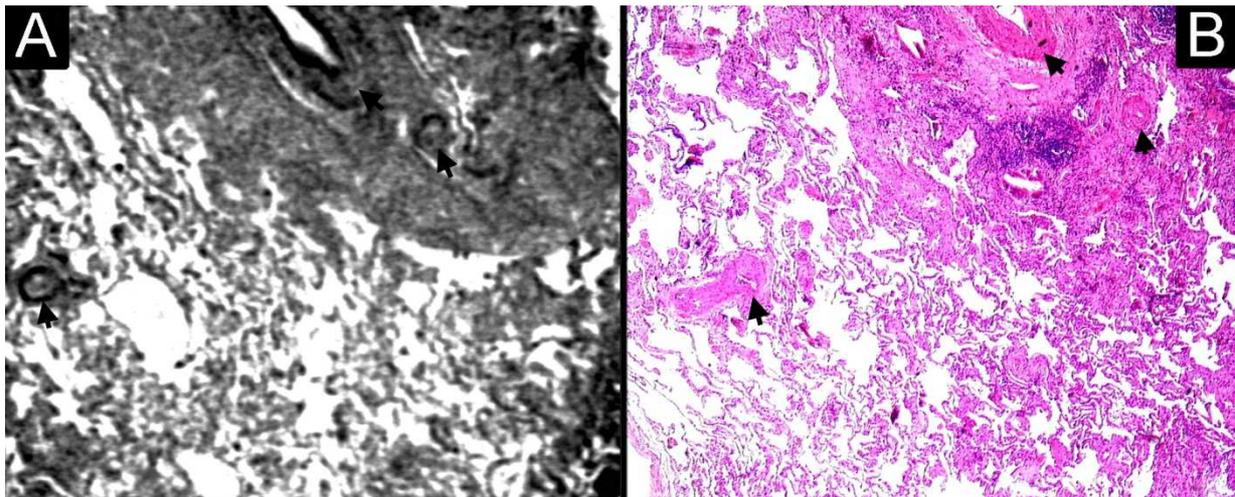


Abb. 20: Micro-CT Schnitt (A) mit korrespondierendem Histologie-Präparat (B)

Wie die Abb. 20 zeigt, ist die Zuordnung zwischen Micro-CT Schichtbild und dem korrespondierenden histologischen Schnittpräparat gut möglich. Hierbei lassen sich besonders die auffälligen Strukturen, wie etwa die Gefäße, deutlich erkennen. Die mit dem schwarzen Pfeil markierten Gefäße zeigen die richtige Positionierung an und sind auf beiden Ansichten übereinstimmend abgebildet. Dabei lassen sich Lumen und Wandstruktur der größeren Gefäße deutlich abgrenzen. Kleinere bzw. venöse Gefäße, die einen dünneren Wandaufbau besitzen, sind hingegen nicht vom Parenchym abgrenzbar. Auch war es nicht möglich, die komplexe Geometrie der Alveolen deckungsgleich abzubilden.

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist die Quantifizierung der Strukturen des gesunden Lungengewebes im Vergleich zu fibrotischem und emphysematösem. Als Parameter dienen dazu der Parenchymanteil (Parenchyma), der Alveolarraum (Air Space) und das Gefäßvolumen (Vascular Volume). Die Abb. 21 zeigt die Ergebnisse des gemessenen Alveolarraumes (air space) und des Parenchyms (Tissue fraction) für gesunde, fibrotische und emphysematöse, humane Lungenproben. Betrachtet man den Alveolarraum, so ist eindeutig zu erkennen, dass bei Lungenfibrose der Luftraum signifikant gegenüber der Kontrolllunge vermindert ist ($p < 0,001$). Des Weiteren zeigt sich, dass der Luftraum bei zentrilobulärem Emphysem in der microtomographischen Messung gegenüber der gesunden Lunge signifikant vermehrt ist ($p < 0,001$). Umgekehrte Resultate lieferte die Bestimmung des Parenchyms. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikant erhöhter Gewebeanteil bei Fibrose, während beim Emphysem das Parenchym vermindert ist ($p < 0,001$).

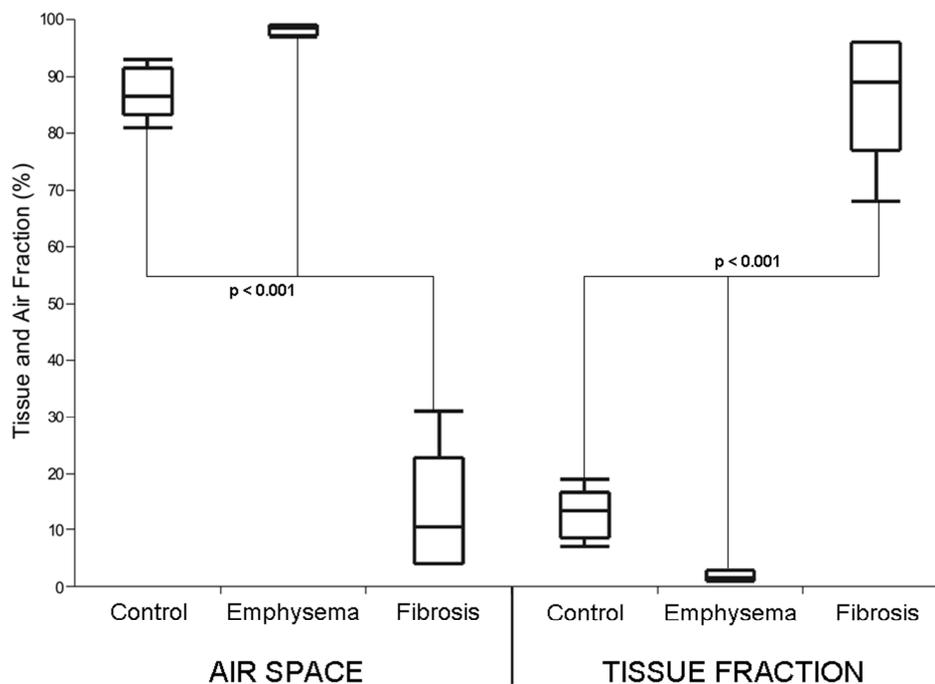


Abb. 21: Quantifizierung Air Space und Tissue Fraction

Darstellung der Volumina von Luftraum (Air space) und Parenchym (Tissue Fraction) für emphysematöse, fibrotische und Kontrolllungen

Abb. 22 zeigt eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse von fibrösen und normalen Proben, nach den unterschiedlichen Fixierungs- bzw. Kontrastierungsmethoden. Ebenso dargestellt ist das Ergebnis der Gefäßvolumenmessung (Vessel). Hierbei ergab sich ebenso ein signifikanter Unterschied ($p < 0,02$) zwischen dem Gefäßanteil der Kontrollproben mit erhöhtem Gefäßan-

teil im Vergleich zu den Fibroseproben, bei denen es zu einem verminderten Gefäßvolumen gekommen ist.

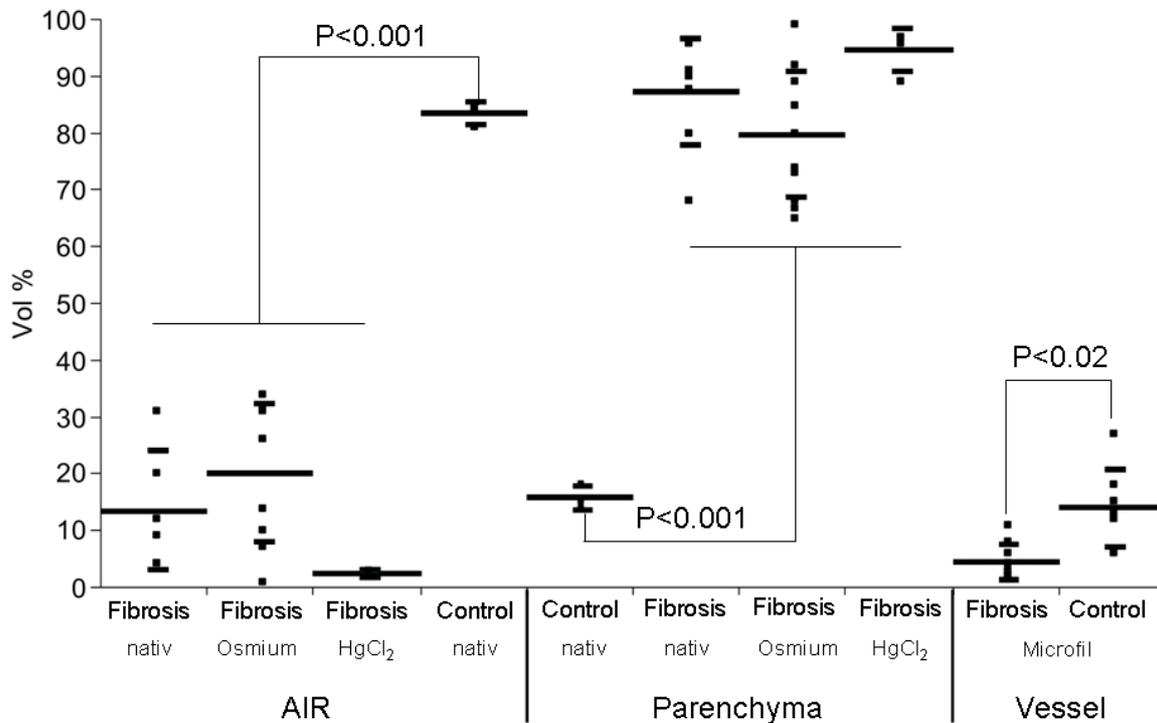


Abb. 22: Zusammenfassung Quantifizierung nach Fixierungsmethode

Zusammenfassende Darstellung der gemessenen Volumina von Luftraum, Parenchym und Gefäßen für fibrotische Proben und Kontrolllungen, aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Fixierungs-/Kontrastierungsverfahren

3.3 Emphysem

10 Proben eines Patienten mit Lungenemphysem wurden in einem Synchrotron gescannt. Die unterschiedlichen Ansichten dieser emphysematösen Proben stellt Abb. 23 zusammen. Bereits in der Makroskopie sind die aufgeweiteten Alveolen sichtbar (**A**, **B**). In **C** zeigt eine MIP Rekonstruktion die Brillanz des Synchrotrons. Hier kommt das feine alveoläre Netzwerk besonders eindrücklich zur Darstellung. Bei einer anderen Darstellung (**D-F**) sind die pathologischen Charakteristika geringer ausgeprägt, jedoch zeigt sich im Vergleich zu Kontrollproben eine Überexpansion der terminalen Luftwege als Zeichen einer destruierten Lungenfeinstruktur. Wie unter 2.2.6 beschrieben, entstand der in Abb. 24 **B** dargestellte isolierte Azinus, welcher von dem in **A** mit einem Stern markierten Bronchius einer Kontrollprobe ausgeht. Bei der fibrotischen Probe lässt sich bereits in der Einzelschicht eine veränderte Architektur des Luftraumes erkennen, der geschlängelt und verzerrt verläuft. Aufgrund der übermäßigen Vermehrung des Parenchyms ist der Luftraum volumengemindert und enthält wenig Luft in

den distalen, kleinen Atemwegen. Dies ist auch in der Rekonstruktion sichtbar, eine normale Azinusbildung kommt nicht zur Darstellung. Die emphysematösen Proben zeigen sowohl dilatierte, als auch verengte Luftwege. Bei diesen Proben lässt sich ebenfalls kein Azinus mit dem beschriebenen Rekonstruktionsalgorithmus identifizieren.

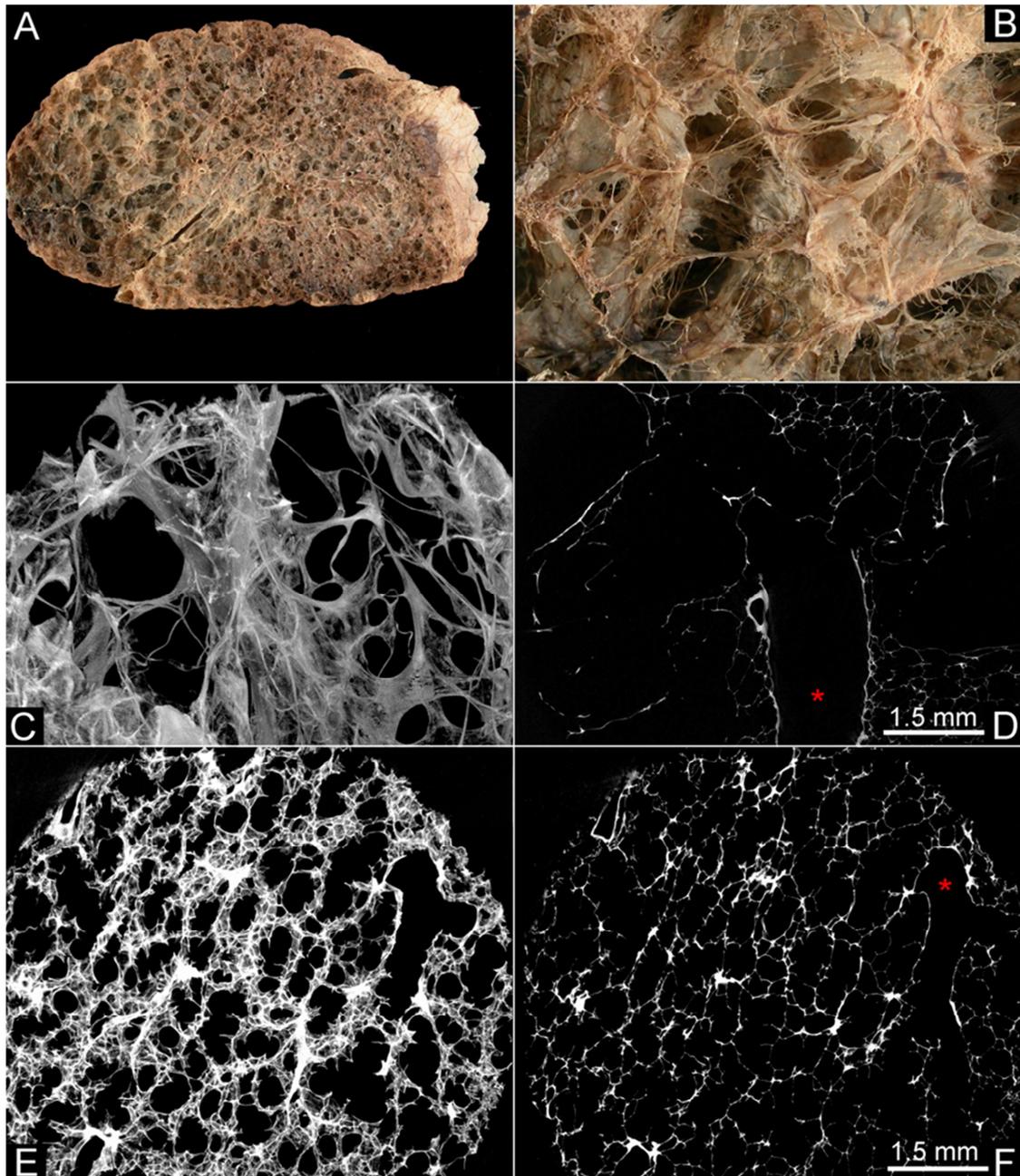


Abb. 23: Darstellung der emphysematösen Lungenproben

- A* Makroskopisches Übersichtsbild
B Makroskopisches Übersichtsbild in 5-facher Vergrößerung
C MIP der Synchrotron Micro-CT Darstellung
D Axiale Einzelschicht mit $1,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße
E MIP der Synchrotron Micro-CT Darstellung
F Axiale Einzelschicht mit $1,9 \mu\text{m}^3$ zu E

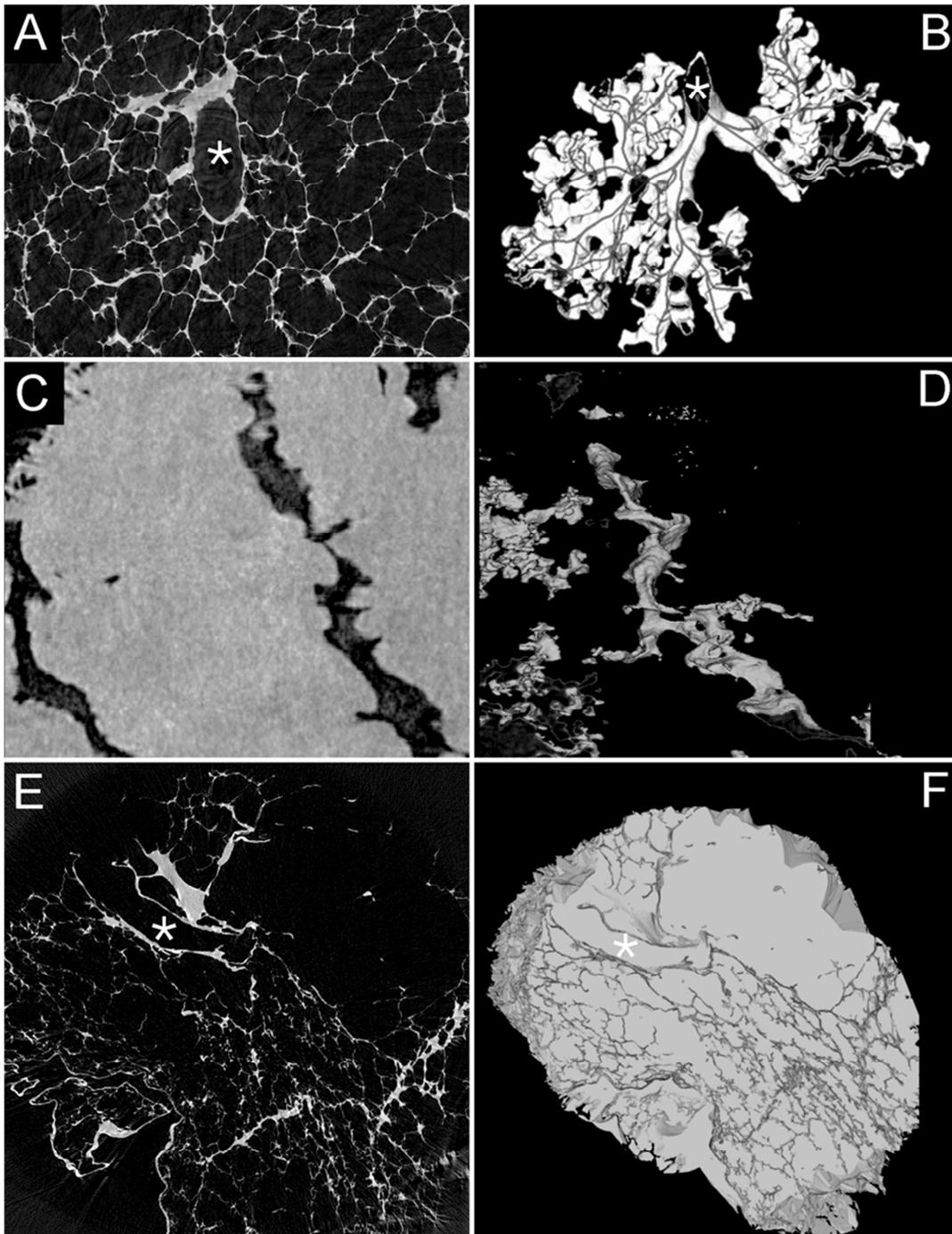


Abb. 24: Rekonstruktion eines Azinus

A Axiale Einzelschicht einer Kontrollprobe

B Dreidimensionale Rekonstruktion des in A markierten Azinus einer Kontrolllunge

C Ausschnitt einer axialen Einzelschicht einer fibrotischen Probe

D Dreidimensionale Rekonstruktion des Luftraumes aus C

E Axiale Einzelschicht einer Emphysemprobe

F Dreidimensionale Rekonstruktion des in E markierten Luftraumes

Zum Schluss sei hier eine Zusammenstellung über die zwei- bzw. dreidimensionale Rekonstruktion des Lungengewebes aller drei Proben­gruppen in Abb. 25 erwähnt. Hierbei sind die 2

dimensionalen Schichtdarstellungen in der unteren Reihe der unterschiedlichen Proben für Kontrolle, Emphysem und Fibrose dargestellt. In der oberen Reihe zeigen sich die 3 dimensionalen Rekonstruktionen dieser korrespondierenden Proben. In der Gegenüberstellung lassen sich deutlich die unterschiedlichen Charakteristika und Pathologien visuell nachvollziehen.

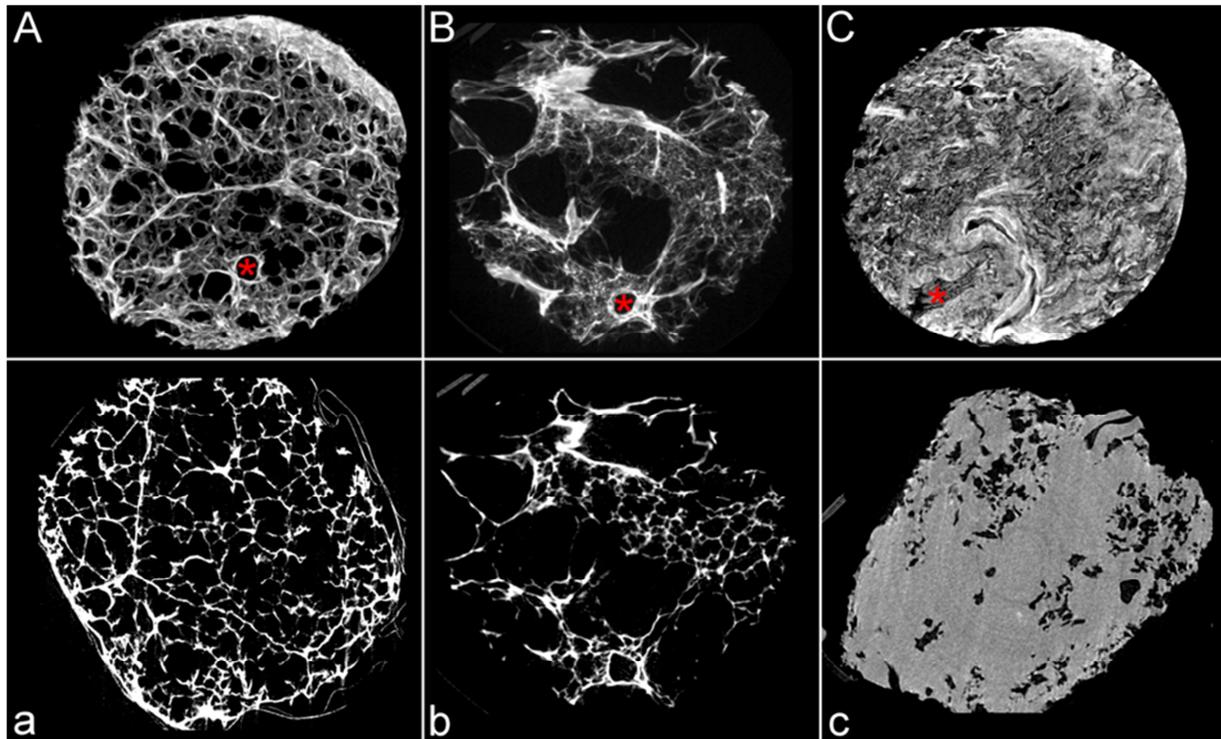


Abb. 25: Vergleichende Darstellung der verschiedenen Lungenproben und ihrer Pathologien

A Dreidimensionale Darstellung einer Kontrollprobe mit markiertem Bronchius (roter Stern)

a Axiale Einzelschicht einer Kontrolllunge

B Dreidimensionale Darstellung einer emphysematösen Probe mit markiertem Bronchius (roter Stern)

b Axiale Einzelschicht einer emphysematösen Probe

C Dreidimensionale Darstellung einer fibrotischen Probe mit markiertem Bronchius (roter Stern)

c Axiale Einzelschicht einer fibrotischen Probe

4. Diskussion

Bedeutendster Bestandteil der klinischen Diagnostik der Lungenfibrose ist die hochauflösende Computertomographie, in der sich die topographische Lokalisation und Ausbreitung, das Muster und die Dimensionierung der fibrotischen Veränderungen detektieren lässt. Quantitative CT-Indexes sowie visuelle CT-Scores stellen hierbei nützliche Hilfen dar. Jedoch ist bei diesem Verfahren die räumliche Auflösung limitiert, weshalb sich einige der mit Fibrose assoziierten Veränderungen, wie etwa die durch die Bindegewebszunahme hervorgerufene Milchglasverschattung oder Konsolidierungen, teilweise schwer von anderen Pathologien mit ähnlichem Muster differenzieren lassen. Weiterhin können kleinere Strukturen, wie die terminalen Bronchioli oder die Acini, nicht abgebildet werden. Bisweilen besteht die einzige Möglichkeit zur Entscheidung zwischen akuten Vorgängen und bereits irreversibel fibrotisch transformierten Veränderungen in der Dokumentation des Verlaufs in wiederholter Bildgebung.

Um die Ausbreitung der Erkrankung zu bestimmen, entwickelten Ashcroft et al. ein histologisches Scoring System (Ashcroft et al. 1988). Taylor et al. beschrieben eine alternative Technik für die quantitative Bewertung der medikamenten-induzierten Lungenfibrose, die auf einer konfokalen Laserscanningmikroskopie basiert (Taylor et al. 2002). Eine andere Möglichkeit der ex-vivo Quantifizierung benutzt ein automatisches, computergesteuertes, optisches System, welches histologische Schnitte über beliebig ausgewählte Evaluationsfelder analysiert (Izbicki et al. 2002).

Mikroskopische Untersuchungen haben sehr erfolgreich eine Korrelation zwischen pulmonaler Struktur und Funktion hergestellt und haben sich als Goldstandard zur Analyse von Lungengewebe etabliert. Trotzdem hat diese Vorgehensweise auch ihre Unzulänglichkeiten. Ein Problem dieses Verfahrens ist die Schwierigkeit, größere Volumina zu beurteilen und das Auftreten von artefiziellen, verfahrensbedingten Distorsionen zu verhindern. Sowohl der Fixierungsprozess mittels der Extraktion von Wasser durch Formaldehydlösung, als auch die mechanische Bearbeitung, wie etwa das Schneiden, beinhalten das Risiko, Artefakte in der Histologie zu erzeugen. Ebenso ist das Verfahren so aufwändig, dass nur einige Mikrometer des Gewebes histologisch aufgearbeitet und stichprobenhaft begutachtet werden können. Der wichtigste Aspekt dabei ist jedoch, dass durch die Herstellung der Schnittpräparate der intakte Zusammenhang des Gewebevolumentums zerstört wird und weitere Untersuchungen anhand derselben Probe mit anderen diagnostischen Methoden schwierig bis unmöglich sind. Im Vergleich hierzu sind die mechanischen oder physikochemischen Artefakte, die durch die Micro-

CT Untersuchung entstehen, unbedeutend, denn auch native, unbehandelte Proben können zunächst verwendet werden. Durch die Micro-CT wird nicht nur eine vollständige Analyse größerer Probenvolumina ermöglicht, sondern auch die Intaktheit der Gewebekontinuität aufrechterhalten und weitere Untersuchungen, wie etwa die dreidimensionale Darstellung ermöglicht. Außerdem wird bei dieser Technik weitgehend auf eine Interpolation der Daten verzichtet, so dass auch die Ergebnisse wahrscheinlich akkurater sind, als die der Histologie, bei der oft Interpolation zur Analyse von Volumina herangezogen wird. Der Vorteil der Histologie liegt in der Möglichkeit der verschiedenen Färbungen, wodurch sich die unterschiedlichen Zellen differenzieren lassen und so beispielsweise Fibroblastenfoci oder Entzündungszellen nachweisen lassen. Außerdem ist zu bedenken, ob nicht analog zu den histologischen Kriterien diagnostische Kriterien für das Micro-CT entwickelt werden können.

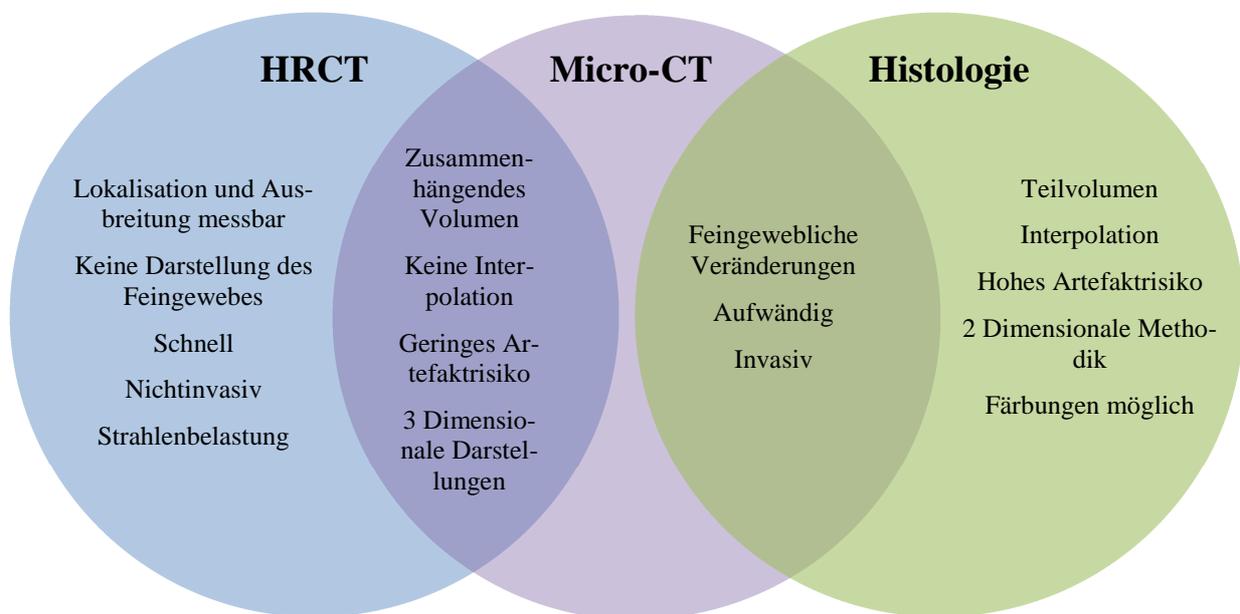
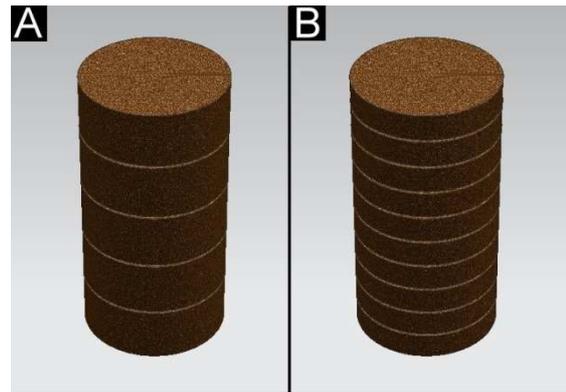


Abb. 26: Vergleich der 3 Diagnostiken HRCT, Micro-CT und Histologie

Die durch das Micro-CT gewonnenen Schnittbilder identifizieren Strukturen, wie Bronchi, Gefäße und Bindegewebe mit sehr genauer Übereinstimmung zu der Histologie, wie die Abb. 20 im Ergebnisteil verdeutlicht. Die in Abb. 20 A verwendete räumliche Auflösung von $8\mu\text{m}^3$ Voxelgröße erlaubt eine präzise Darstellung der Lungenfeinstruktur. Während die Dicke der Histologie ca. $6\mu\text{m}$ beträgt, unterliegt der Micro-CT Datensatz anhand der Voxelgröße von $5-18\mu\text{m}^3$ einer anderen Unterteilung. Daher ist es wichtig, die Voxelgröße an die Schichtdicke der Histologie anzupassen, um möglichst identische Schnittebenen zu erzeugen (s. Abb. 27). Ebenso wird aber auch die Detailauflösung durch die gewählte Voxelgröße limitiert. Außerdem ist zu bedenken, in wie weit die empfindliche Strukturen der Alveolen durch den histologischen Fixierungsprozess verändert wurden.

Abb. 27: Schichtdicke

Wird die Voxelgröße des Scans in A doppelt so groß gewählt, wie die Schichtdicke der Histologie in B, können auch nur halb so viele Ansichten der Probe rekonstruiert werden und es ist nicht möglich, die identische Schnittebene darzustellen



In der Diagnostik des Lungenemphysems gehört neben der Spirometrie ebenso die HRCT zu den wesentlichen diagnostischen Maßnahmen mit zuverlässigster Korrelation zwischen radiologischer Quantifizierung und morphometrischen Untersuchungen (Sanders 1991). Zur Quantifizierung stehen hierfür ein subjektiver Score von Bergin et al. (Bergin et al. 1986) oder semiautomatische, standardisierte Software Programme zur Verfügung (Kinsella et al. 1990). Eine Probengewinnung mit histologischer Untersuchung ist hierbei in der klinischen Vorgehensweise zurzeit nicht üblich.

Ergebnisse aus Tierstudien beweisen die exzellente Möglichkeit der Micro-CT Technik in der 3 dimensionalen Darstellung, Quantifizierung und morphologischen Analyse von alveolärem Gewebe (Litzlbauer et al. 2006), der pulmonalen Gefäßarchitektur (Ritman 2005; Karau et al. 2001) und ihrer Angiogenese (Wietholt et al. 2008) sowie diverser Pathologien, u.a. auch der medikamentös oder strahleninduzierten Lungenfibrose (Plathow et al. 2004; Shofer et al. 2008; Lee et al. 2008), den pathologischen Veränderungen der COPD (Hogg et al. 2009) sowie des Lungenemphysems in und ex vivo (Parameswaran et al. 2009; Froese et al. 2007; Ford et al. 2009; Kawakami et al. 2008; Postnov et al. 2005). 2009 erfolgte eine 3 dimensionale Messung des Luftraumes in normalen und emphysematösen Lungenproben von Mäusen (Parameswaran et al. 2009).

Auch an humanen Lungengewebeproben konnte die Qualität der microtomographischen Scans überzeugen. Bisherige Studien anhand von menschlichem Lungengewebe beschreiben Messungen der Luftwege (me Carroll et al. 2009) bzw. der COPD (Hogg et al. 2009) und eine Darstellung der Alveoli mit virtueller Endoskopie eines Ductus alveolaris in einer normalen Lunge und einer mit zentrilobularem Emphysem (Watz et al. 2005). Litzlbauer veröffentlichte eine Rekonstruktion eines humanen Azinus mittels Synchrotron-Micro-CT (Litzlbauer et al. 2010).

In unserer Studie konnten wir erstmalig belegen, dass sich die Microcomputertomographie vorzüglich eignet, um die Pathologien der Lungenfibrose und des Lungenemphysems an

menschlichem Gewebe zu untersuchen. Ebenso konnten wir die hervorragende Eignung der Microtomographie zur Quantifizierung der unterschiedlichen Strukturen, wie Parenchym, Luftraum und Gefäßvolumen, demonstrieren. Aus dem Verhältnis dieser Messergebnisse lässt sich z.B. der Schweregrad einer fibrotischen bzw. emphysematösen Erkrankung schließen, bzw. eine diagnostische Zuordnung zu einer der beiden Pathologien treffen.

Die gemessene erhöhte Parenchymdichte bei dem Vorliegen einer Lungenfibrose, sowie der erhöhte lufthaltige Anteil beim Lungenemphysem sind durch die bereits dargestellten Definition und Pathogenese bereits ausreichend erläutert und beweisen die Korrektheit der mikrotomografischen Quantifizierung.

Weiterhin wurden die gemessenen Parenchymvolumina nach den unterschiedlichen Kontrastierungsverfahren aufgeschlüsselt (Abb. 22). Die Abweichungen zwischen den gemessenen Volumina innerhalb einer Gruppe könnten sowohl auf unterschiedlich ausgeprägte Schweregrade der Fibrose zurückschließen, als auch auf methodenspezifische Prozesse hindeuten. Die nativ fixierten Proben sind jedoch nicht zusätzlich artifiziell beeinflusst durch eine Kontrastierungsbehandlung. Die osmierten Proben ergeben im Vergleich zu den Nativ-Proben eine ähnliche Verteilung der Meßwerte, was für eine geringe Einflussnahme des Osmierungsprozesses auf die ursprüngliche Gewebevolumina sprechen könnte. Die mit Bouninscher Lösung behandelten Proben zeigen einen geringeren Mittelwert, jedoch wurden nach dem Nachweis von deutlicher, randständiger Kontrastmitteledeposition mit folgender Beeinträchtigung im standardisierten Quantifizierungsprozess hiernach zu wenig Proben untersucht, um genauere Aussagen im Vergleich zu den anderen Kontrastierungsverfahren zu treffen.

Weiterhin fanden wir bei den fibrotischen Proben eine Verminderung des totalen Gefäßvolumens verglichen mit Kontrollproben. Die Formierung neuer Gefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen wird als Angiogenese bezeichnet und ist ein wesentlicher Teil von physiologischen und pathologischen Heilungsprozessen des Organismus.

Die Rolle der Angiogenese bei pulmonaler Fibrose wird in der Literatur weitgehend behandelt, wobei im Allgemeinen eine Verminderung der Gefäßdichte beschrieben wird. Bis zum aktuellen Zeitpunkt ist unsere Studie die erste, welche für die Gefäßquantifizierung nicht mit einem Tiermodell sondern mit menschlichem Lungengewebe arbeitet und sich auf eine Quantifizierung mittels Microtomographie beruft. Die Micro-CT hat sich bereits in anderen Bereichen als ein äußerst geeignetes Verfahren zur Darstellung und Messung von vaskulären Strukturen behauptet (Garcia-Sanz et al. 1998; Karau et al. 2001). Ebinae et. Al. evaluierten die interstitielle Kapillardichte bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose mit histologischen Färbungen gegen CD34 und von Willebrand Faktor (Ebina et al. 2004). Dabei wiesen sie in

Arealen mit mäßiger Fibrotisierung eine erhöhte und bei starker Fibrose eine verminderte kapilläre Dichte nach. Korrespondierend hierzu ließen sich in den untersuchten Proben entweder erhöhte oder reduzierte Konzentration von angiogenesestimulierenden Faktoren, wie der Endotheliale Wachstumsfaktor oder Interleukin 8, nachweisen. Dieses histologische Verfahren bestätigt unseren Nachweis des verminderten totalen Gefäßvolumens.

Peao et al. untersuchten licht- und elektronenmikroskopisch die mikroanatomischen, vaskulären Veränderungen in einem Bleomycin Tiermodell der Lungenfibrose (Peao et al. 1994). Dabei fiel die Neof ormation eines elaborierten Gefäßnetzwerkes in fibrotischen Arealen sowie peribronchial dominierend in Kombination mit einer Distorsion der alveolarkapillären Gefäßarchitektur auf. Diese atypischen Gefäße schienen von den Bronchialarterien auszugehen und zeigten weiterhin epitheliale Veränderungen. Andere Studien über elektronenmikroskopisch darstellbare Gefäßvariationen bei der Bleomycin –induzierten Lungenfibrose evaluierten den irregulären Verlauf der Kapillaren, wie wir ihn dreidimensional abbilden konnten, sowie einen erhöhten Gefäßdurchmesser mit variablen Dilatationen und eine Verminderung der kapillären Aufzweigungen (Schraufnagel et al. 1986; Kwon et al. 1991). Diese Veränderungen führten ebenso wie in unseren Ergebnissen insgesamt zu einer Abnahme der Gesamtoberfläche der Kapillaren.

Mit unserer Quantifizierung des Gefäßvolumens tragen wir zu dieser Diskussion bei, wobei unsere Messung mittels der Microtomographie an humanem Gewebe bisher einmalig ist. Unsere dreidimensionalen Darstellungen bestätigen die Ergebnisse der histologischen Studien, indem sie den bei Lungenfibrose beschriebenen atypisch geschlängelt, gewundenen Gefäßverlauf in seiner gesamten Ausprägung abbilden. Diese Veränderungen lassen sich visuell gut von dem Gefäßbaum der Kontrollproben unterscheiden. In Abb. 18 wurde zudem gezeigt, dass es bei den fibrotischen Proben insgesamt zu einem vermehrten Nachweis von Abbrüchen des Kontrastmittels kommt. Hierbei bleibt natürlich unbeantwortet, ob es an einer tatsächlich vorhandenen Abwesenheit von Gefäßen liegt, ob die Gefäße einfach artifiziell nicht dargestellt wurden, z.B. aufgrund eines zu niedrigen Druckes beim Einspritzen des Kontrastmittels oder einer zu niedrig gewählten Dosierung bzw. einer zu hohen Viskosität oder ob die Gefäße aufgrund einer Pathologie (z.B. einer Stenosierung) schlechter zu perfundieren waren.

Die dreidimensionale Rekonstruktion eines humanen Azinus mittels des von Litzlbauer beschriebenen Rekonstruktionsalgorithmus (Litzlbauer et al. 2010) ist bei den Kontrollproben anwendbar und liefert einen physiologisch konfigurierten Azinus, während bei fibrotischen Proben eine pathologische Morphologie der verengten Luftwege zur Darstellung kommt. Bei den emphysematösen Proben ist eine Rekonstruktion hingegen nicht möglich, die aufgeweite-

ten Luftwege werden von dem Algorithmus nicht erkannt, so dass hier eine Rekonstruktion nicht möglich ist.

Die unterschiedlichen dreidimensionalen Darstellungsmöglichkeiten und Variationen mit ihren Vorteilen und Grenzen wurden vorangehend anschaulich erläutert. Hierbei haben u.a. Schichtanzahl und Projektionstyp Einfluss auf die Qualität. Die Rekonstruktion des Parenchyms bildet zwar die Verminderung bzw. Erhöhung des Parenchyms ab, erbringt jedoch in Anbetracht der durchgeführten Messergebnisse keine zusätzlichen Informationen. Im Gegensatz dazu lassen sich bei der Gefäßrekonstruktion erst in der dritten Dimension die pathologischen Gefäßveränderungen nachvollziehen, welche als Diagnostikum herangezogen werden könnten.

Die Synchrotronstrahlung, die wir nutzten, um die rarefizierten, filigranen Septen der Emphysemlungen bestmöglich abzubilden und zu quantifizieren, liefert eine bessere Bildauflösung mit detaillierterer Abbildungsqualität im Vergleich zur Mikrofokusröntgenröhre. Aufgrund der geringeren Verfügbarkeit bleibt diese Technik aber speziellen Fragestellungen vorbehalten.

Insbesondere das zarte Lungenparenchym bietet nicht die natürlichen, idealen Eigenschaften, wie sie beispielsweise das Knochengewebe besitzt und muss deshalb durch Kontrastierung und Fixierung vorbehandelt werden. Der Kontrast eines Gewebes wird dadurch erhöht, indem man ein Element mit höherer Röntgendichte, welches dafür eine höhere Ordnungszahl im Periodensystem der Elemente besitzen muss, einbringt. Weiterhin ist zu beachten, dass die organische Elastizität, ein Hauptelement der Atemmechanik, das Organ nach der Entnahme auf etwa ein Drittel seiner Ursprungsgröße kollabieren lässt. Eine realitätsnahe Abbildung der in vivo existierenden Lungenarchitektur kann nur erfolgen, wenn die tatsächliche räumliche Ausdehnung wiederhergestellt wird.

In dieser Studie untersuchten wir weiterhin verschiedene Methoden zur Konservierung und Kontrastierung des physiologischen als auch pathologischen Lungenfeingewebes in Hinblick auf qualitative und quantitative Messungen und Darstellung im Mikrotomographen.

Die native Fixierung mit heißem Formalindampf erwies sich schon an porcinem Lungengewebe als geeignete Methode zur microtomographischen Untersuchung (Litzlbauer et al. 2006). Bereits 1980 entwickelten Rau und Mittermeier (Rau et al. 1980) ein Verfahren für die Formalindampfbeatmung in Inspirationsstellung.

Eine Modifizierung des Lungengewebes durch Formalinfixation ist bekannt, so werden die Proteine, wie beispielsweise das enthaltene Kollagen oder Elastin, denaturiert und die Probe wird dehydriert. Als Konsequenz kann ein mittlerer Volumenverlust von bis zu 20% auftreten

(Lum et al. 1995), wobei wir in unserer Studie keine Schrumpfung der Gewebeprobe beobachteten.

Das Kontrastmittel Osmiumtetroxid (OsO_4) besitzt die Ordnungszahl 76 und oxidiert die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran, an welche es irreversibel bindet. Diese Schwermetalleinlagerung ist sichtbar als schwarze, metallische Färbung der Probe und stellt das reduzierte Osmium (OsO_2 bzw. metallisches Osmium) dar (Adams et al. 1960). Seit Jahrzehnten wird die Osmierung bereits in der Elektronenmikroskopie für verschiedenste Gewebe genutzt und hat sich auch bei der Verarbeitung von Lungenparenchym bewährt (Low et al. 1954; Kanamura 1972). Auch bei der Kontrastierung von Lungengewebe für die Microtomographie wird die Osmiumtetroxidbehandlung in Kombination mit der Kritisch-Punkt Trocknung bereits angewandt (Litzlbauer et al. 2006; Ritman 2005; Hogg et al. 2009). Es wird davon ausgegangen, dass es durch das Verfahren zu keiner osmotischen Volumenänderung kommt (Wangenstein et al. 1981).

Eine Kontrastierung mit Silbernitrat bzw. Silberlösung wird in der Literatur mit verschiedenen Ergebnissen diskutiert. Eine Studie mit humanem Lungengewebe ergab eine inhomogene Kontrastierung (Watz et al. 2005), während mit einem kommerziell erhältlichen Färbungskit, welches bei emphysematösem murinem Lungengewebe angewandt wurde, eine solche Beobachtung nicht gemacht wurde (Parameswaran et al. 2009). Das zuletzt genannte Verfahren basiert auf einer von Merrill et al. beschriebenen photochemischen Methode (Merrill et al. 1981). Um Gefäße messen oder darstellen zu können, muss eine intravaskuläre Kontrastmittelgabe erfolgen. Langheinrich untersuchte 2008 die Qualität in der Perfusion für die beiden kommerziell erhältlichen und weit verbreiteten Kontrastmittel Microfil und Bariumsulfat. Hierbei zeigte sich eine signifikant stärkere Gefäßperfusion für Microfil im Gegensatz zu Bariumsulfat (Langheinrich et al. 2008), weshalb die Wahl des Kontrastmittels zur Gefäßperfusion in dieser Studie auf Microfil fiel.

Zur Darstellung und Quantifizierung von Gefäßsystemen in verschiedenen Organen wird das Kontrastmittel Microfil bereits seit den 60er Jahren verwendet (Cortell 1969; Langheinrich et al. 2006; Young et al. 2008; Bentley et al. 2007; Garcia-Sanz et al. 1998). Auch die Abbildung der pulmonalen Gefäßarchitektur erfolgte mit Kontrastmittel, welches als Zweikomponentensystem auf einer Silikon-Blei-Basis besteht (Ritman 2005). Das hydrophobe Kontrastmittel ermöglicht eine homogene Perfusion und besitzt im Gegensatz zu etwa bariumsulfathaltigem Kontrastmittel eine geringere Viskosität, was eine bessere kapilläre Penetration und einen stabilen Ausguss von Gefäßen ermöglicht. So können bereits Gefäße mit einem Durchmesser unter $20\mu\text{m}$ evaluiert werden (Marxen et al. 2004). Des Weiteren hat Microfil

polymere Eigenschaften, die eine Penetration in den extravaskulären Raum verhindern. Es ist einfach zu handhaben, härtet langsam aus und ist in fünf verschiedenen Viskositätsstufen erhältlich.

Die in unserer Studie verwendeten intervaskular kontrastierten Proben dienen der Quantifizierung der pulmonalen Gefäßstrombahn. Die Qualität der Perfusion zur Verifizierung der homogenen Kontrastierung aller Gefäßanteile wurde sowohl in der Einzelschichtdarstellung als auch mittels dreidimensionaler Oberflächenrekonstruktionen überprüft. Dabei konnten besonders gut die Kontinuität der Gefäßverläufe durch das „Durchfahren“ der aufeinander folgenden Schichten beurteilt und Gefäßabbrüche detektiert werden.

Nach einer Fehlperfusion aufgrund zu starken Druckes beim Einspritzen des Kontrastmittels Microfil in das Gefäßbett kam es bei ca. 8% der Proben zu einer Ruptur eines Gefäßes und infolge dessen zu der Verteilung des Kontrastmittels im umliegenden Gewebe. Diese Scans können nicht mehr für Quantifizierungen verwendet werden. Obwohl die Proben makroskopisch auf Fehlperfusion kontrolliert wurden, ist dies oftmals erst im Scout view zu erkennen, da das Kontrastmittel sich bis in die Tiefe des Gewebes verteilt, so dass oberflächlich nur ein geringer Anteil der Kontrastmittelanreicherungen beurteilt werden kann. Je nachdem, in welchem Gefäßabschnitt die Läsion auftritt, können die vorausgehenden Gefäße noch ausreichend gut perfundiert und beurteilbar sein.

In der invertierten Abbildung fällt bei einigen Proben hingegen auf, dass sich das intervaskular deponierte Microfil Kontrastmittel nicht immer homogen in der gleichen Dichte anreichert. Insbesondere in größeren Gefäßen mit viel Kontrastmittelvolumen sind unterschiedliche Grauwerte des Microfils zu finden. Dies ist besonders bei den quantitativen Messungen zu berücksichtigen, da nun der die Gefäße markierende Dichtewert bzw. Treshold eine größere Spanne umfassen muss und damit die Qualität der Messung durch die Differenzierung von Gewebe und Gefäßsystem aufgrund überschneidender Dichtewerte erschwert ist.

Im Hinblick auf die verschiedenen Kontrastierungs- bzw. Fixierungsverfahren des Parenchyms, die in dieser Studie angewandt wurden, zeigten sich in der Volumenmessung der mit Osmium oder Bouninscher Lösung behandelten Proben keine signifikanten Volumenänderungen wie z.B. Schrumpfungen zwischen den unterschiedlich behandelten Proben im Verhältnis zum nativ belassenen Gewebe. Die mit Osmiumtetroxid kontrastierten Proben zeigen deutliche Unterschiede in der Detailgenauigkeit des Parenchyms gegenüber den nativ fixierten Proben auf. Hier lassen sich große Gefäße anhand ihrer Wandstruktur erkennen und kleinste Alveolen darstellen. Ebenso ermöglicht das Verfahren das Netzwerk der dünnen Alveolarwände in seiner Gesamtheit abzubilden. Darüber hinaus lassen sich die morphometrisch

unterschiedlichen Strukturen (Alveolen, Bronchioli, Septen) voneinander differenzieren und ihrem histologischen Korrelat zuordnen.

Die mit Bouinscher Lösung behandelten Lungenproben zeigen eine vollständige Kontrastierung der Probe. Die Qualität und Detaillierung der Darstellung des Parenchyms ist allerdings geringer, als bei der Osmierung, jedoch besser als bei nativer Behandlung.

In den nativ fixierten Proben kommt das Gewebe homogen zur Darstellung. Bei starker Ausprägung der Fibrose ergeben sich keine Nachteile im Vergleich zum kontrastierten Gewebe in Bezug auf die Vollständigkeit der Scanabbildung. Jedoch lassen sich die unterschiedlichen Strukturen des Parenchyms und der lufthaltigen Alveolarräume nicht differenzieren.

Bei den fibrotischen Proben mit hohem Parenchymanteil zeigen die mit Osmiumtetroxid behandelten Proben eine vermehrte randbetonte Anreicherung mit Streustrahlung in diesen Bereichen. Während sich bei 4 von 9 mit Osmium behandelten Proben das Kontrastmittel gleichmäßig randständig in einer durchschnittlich 0,58mm dicken Schicht anreichert, ist die Deposition der Bouinschen Lösung wesentlich geringer. Dies könnte eventuell durch vermehrte Waschungen bei Proben mit hohem Gewebeanteil reduziert werden.

Im Gegensatz zu den fibrotischen Proben sind die filigranen Septen der Kontrollproben wesentlich schwieriger darzustellen. Streustrahlung ist bei diesen Proben äußerst hinderlich, da sie leicht mit den Alveolarsepten verwechselt werden bzw. diese überdecken kann. Zudem kann sie in der automatischen Quantifizierung mitgemessen werden. Bei den in unserer Studie behandelten Kontrollproben kam es zu keiner vergleichbaren Anreicherung des Osmiums, wie es bei den fibrotischen Proben der Fall war.

Mit der nativen Formalinfixierung verhindert man das Auftreten von Streustrahlung, wobei wir vermehrt Ringartefakte beobachten. Konzentrische Ringartefakte traten bei 5 von 56 Proben auf (ca. 9%), bevorzugt bei nativer Fixierung. Sie entstehen durch einen schlecht eingestellten Detektor, indem kontinuierlich die auftreffende abgeschwächte Strahlung falsch, zu hoch oder zu niedrig, bewertet wird (Barrett/Keat 2004) und beeinträchtigen die Bildqualität, verfälschen jedoch nicht die quantitativen Messungen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die Quantifizierungen eine Kontrastierung nicht notwendig ist. Allerdings lässt sich die Feinstruktur der Lunge mit einer Kontrastierung wesentlich besser beurteilen, so dass wir empfehlen, diese durchzuführen.

Wir konnten zeigen, dass für einen Nachweis atypischer Verläufe der kleinen Gefäße bzw. deren Quantifizierung in fibrotischen Lungenproben mittels eines klinischen CT die verwendete Voxelgröße unter 250 μm bzw. einem Voxelvolumen unter 0,157 mm^3 liegen sollte. Hieraus lässt sich ein klinischer Nutzen ableiten, wobei weitere Untersuchungen genauere Anga-

ben über die Häufigkeit dieser Gefäßpathologien und damit über ihre diagnostische Wertigkeit erbringen müssen.

Eine klinische Anwendung der Microtomographie in der Diagnostik von Lungenpathologien ist unwahrscheinlich. In dieser Studie wurde lediglich die generelle Darstellbarkeit einer IPF bzw. eines Emphysems mittels Micro-CT untersucht, eine diagnostische Zuordnung oder Klassifizierung, wie es klinisch notwendig ist, erfolgt zur Zeit über die Histologie und ist microtomographisch noch nicht untersucht. Zur Anwendung des Verfahrens muss eine Lungenbiopsie erfolgen. Dies ist bei Lungenfibrose aktuell nur bei 10% der Patienten indiziert, wenn im HRCT kein UIP typisches Muster detektierbar ist bzw. durch Klinik oder Anamnese Zweifel an der radiologischen Diagnose bestehen (ATS 2000). Davon ist wiederum bei 15-20% der Patienten mit einer ILD die Diagnose auch nach einer Gewebeuntersuchung noch nicht eindeutig geklärt. Zu beachten ist auch, dass durch die klinisch relevante Diagnostik des HRCT nicht die Lungenfeinstruktur abgebildet wird, sondern lediglich 10% des Parenchyms dargestellt werden (Beigelman-Aubry et al. 2005) und wie bereits erwähnt, die Sensitivität des HRCT in der Diagnostik der IPF etwa 88% beträgt, besonders milde Verläufe können dabei unerkannt bleiben (Orens et al. 1995). Zur Beantwortung der Frage, ob die Micro-CT in diesen Fällen eventuell einen diagnostischen Nutzen liefern kann, müssten noch weitere Untersuchungen folgen. Bei der Erkrankung des Lungenemphysems ist die Durchführung einer Biopsie hingegen bislang nicht üblich, so dass eine microtomographische Gewebeuntersuchung hierbei auf Ausnahmefälle beschränkt wäre.

Da die Micro-CT allerdings in der Lage ist, verlässlich die strukturellen Veränderungen des Parenchyms bei Emphysem und Fibrose anzuzeigen, können diese Untersuchungen vielleicht dazu beitragen, die Pathophysiologie dieser Erkrankung besser zu verstehen und neue Möglichkeiten von Therapie oder Diagnostik abzuleiten.

Im HRCT ist die Spezifizierung der Ursache von Veränderungen der Parenchymdichte oft schwierig zu treffen, weil die zugrundeliegenden pathologischen Prozesse aufgrund der geringen Auflösung nicht richtig abgebildet werden können. So kann beispielweise die Milchglasverschattung durch eine Obliteration der kleinen Luftwege verursacht sein, allerdings auch durch Parenchymproliferation, durch Hyperperfusion oder durch einen verminderten Luftanteil. Die örtliche Auflösung der Micro-CT übertrifft die der HRCT um den Faktor 100 und kann helfen, die grundlegenden Veränderungen darzustellen, wozu die CT Scanner aktuell nicht in der Lage sind. Daher können die Beobachtungen des Lungenfeingewebes in den Micro-CT Darstellungen wichtige Informationen für die Interpretation von HRCT Befunden liefern, weshalb die Micro-CT als ein zusätzliches Werkzeug für ex-vivo Studien von Patho-

logien der menschlichen Lunge in Kombination mit klinisch etablierten bildgebenden Verfahren genutzt werden könnte.

Weitere Forschungen könnten darüber hinaus die morphometrischen Unterschiede in zwei- und dreidimensionaler Darstellung zwischen den einzelnen ILD und die Entwicklung eines Score Systems zur Bestimmung von Schweregraden von Emphysem bzw. Lungenfibrose beispielsweise anhand der gemessenen Parameter (Parenchymanteil/ Luftraumanteil) einschließen.

Einflussfaktoren auf die Qualität und Auswertung der Scans stellt die Erzeugung von Streustrahlung dar. Diese entstehen durch Compton Strahlung. Wichtig ist zunächst einmal die Vermeidung der Streustrahlen mit dem Ziel, eine hohe Qualität der Scans zu erreichen, indem die Scanparameter optimal ausgewählt werden und verschiedene Filter zur Reduzierung von Artefakten verwendet werden. Bei dem Auftreten der nicht immer verhinderbaren Streustrahlen gewinnt die richtige Wahl des manuell einstellbaren Thresholds eine größere Bedeutung. Dieser wird solange vom Benutzer erhöht, bis die ausgewählte Fläche möglichst deckungsgleich zu dem Original wird. Gerade bei filigranen Strukturen, wie dem Alveolarnetz einer gesunden, menschlichen Lunge oder feinen Gefäßen, ist auf gute Kongruenz zu achten, da ansonsten das Messergebnis fehlerhaft wird. Im Lungengewebe zeigen die Streustrahlen meist gleiche Dichtewerte wie das Parenchym und werden daher bei der Setzung des Thresholds mit einbezogen. Da sie zu klein und zu zahlreich sind, lassen sie sich nicht vollständig, beispielsweise mit dem Edit Programm, entfernen (s. Abb. 15). Besonders problematisch ist die Erhöhung der Dichte des Parenchyms durch Streustrahlung, was besonders bei der intervaskulären Kontrastierung auftritt.

Zu beachten bei den quantitativen Messungen ist die ausgewogene Schätzung zwischen Verlust des zu messenden tatsächlichen Gewebes durch zu niedrigen Threshold und einem fälschlich erhöhten Messergebnis durch markierte Streustrahlung bei zu hohem Threshold.

In unserer Studie konnten wir demnach die Eignung der Microcomputertomographie zur Gewinnung wichtiger Informationen zum menschlichen Lungenfeingewebe unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen demonstrieren.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsch

HINTERGRUND: Ziel der Arbeit ist es nachzuweisen, dass die Micro-CT als bildgebendes Verfahren für die Analyse humaner Lungenarchitektur bei verschiedenen patophysiologischen Veränderungen der Lungenfeinstruktur geeignet ist.

MATERIAL UND METHODEN: 27 humane Lungenproben, welche von einer Autopsie stammen oder von Patienten mit schwerer Lungenfibrose bzw. zentrilobulärem Emphysem chirurgisch entfernt wurden, wurden im Microtomographen (Micro-CT) gescannt und mit 28 Kontrollproben verglichen. Die fibrotischen Proben wurden zusätzlich mit Osmiumtetroxid, Bouninscher Lösung und dem intervaskulärem Kontrastmittel Microfil kontrastverstärkt. Die emphysematösen Proben wurden volumenkontrolliert durch ein Formalinverdampfungsverfahren fixiert. Anschließend wurden die Parameter Soft Tissue Fraction (Parenchym), Total Air Space Fraction (Lufträume) und Vascular Volume Fraction (Gefäßvolumern) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden durch Histologie bestätigt. Die Analyse der Messergebnisse erfolgte mit Varianzanalysetests (ANOVA).

ERGEBNISSE: Die quantitative Micro-CT Analyse zeigte eine signifikante Vermehrung des Soft Tissue Volumes der fibrotischen Lungen ($87 \pm 10\%$ vs. $17 \pm 9\%$, $p < 0.001$) sowie eine signifikante Reduzierung des Total Air Spaces im Vergleich zu den Kontrollproben ($13 \pm 8\%$ vs. $83 \pm 23\%$, $p < 0.001$). Gleichzeitig ließ sich bei Fibrose ein signifikant reduziertes Gefäßvolumen (Vascular Volume Fraction) gegenüber nichtfibrotischen Lungen ($4 \pm 2\%$ vs. $14 \pm 8\%$, $p < 0.03$) nachweisen. Im Gegensatz dazu demonstrierten die Proben mit schwerem Lungenemphysem eine signifikante Erhöhung des Total Air Spaces und ein signifikant erniedrigtes Soft Tissue Volume verglichen mit den Kontrollen ($p < 0.001$).

SCHLUSSFOLGERUNGEN: Unsere Ergebnisse zeigen, dass Micro-CT für quantitative Analysen und Bewertungen der Lungenfeinstruktur und deren Pathologien eine höchst geeignete Methode darstellt.

5.2 Englisch

BACKGROUND: To evaluate the feasibility of micro-CT imaging for analysis of the human lung in different pathophysiological alterations of the lung fine-structure.

MATERIALS AND METHODS: Using micro-computed tomography (micro-CT), 27 human lung samples derived from autopsy and/or resection from patients with severe lung fibrosis or with severe centrilobular emphysema were scanned and compared to controls (n = 28). Fibrotic samples were prepared and scanned contrast enhanced (Osmium or intravascular lead-containing dye). Samples with emphysema were volumecontrolled fixed with hot formalin vapor. Soft tissue fraction, total air space fraction and vascular volume fraction were quantified. Results were complemented by histology. Differences on structural changes of the lung were analyzed by variance statistics (ANOVA).

RESULTS: Quantitative micro-CT analysis showed a significant increase in soft tissue volume (fibrosis) of the lungs ($87 \pm 10\%$ vs. $17 \pm 9\%$, respectively; $p < 0.001$) and a significant reduction in total air space compared to controls ($13 \pm 8\%$ vs. $83 \pm 23\%$, respectively; $p < 0.001$). Simultaneously, samples with lung fibrosis showed a significant reduction in vascular volume fraction compared to controls ($4 \pm 2\%$ vs. $14 \pm 8\%$, respectively; $p < 0.03$). In contrast, lung samples with severe emphysema demonstrated a significant increase in total air space and a significant decrease in soft tissue volume compared to controls ($p < 0.001$).

CONCLUSION: Our findings indicate that micro-CT is feasible for structural evaluation of patho-physiological alterations of the human lung fine-structure.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AAT	Alpha 1 Antitrypsin
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AIP	Acute Interstitial Lung Disease
AIP	Acute interstitial pneumonia
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
ANOVA	Analysis of variance
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BIP	Bronchiolitis Interstitial Pneumonia
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCD	Charged Coupled Device
CD	Cluster of differentiation
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
COP	Cryptogenic organising pneumonia
COPD	Chronic Obstructive Pulmonal Disease
CPD	Critical Point Dryer
CT	Computertomographie
d.h.	Das heißt
DIP	Desquamative Interstitial Pneumonia

DLCO	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
DMP	2,2-Dimethoxypropan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPLD	Diffuse parenchymale Lungenkrankheiten
ERS	European Respiratory Society
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität
FGF	Fibroblast Growth Factor
FVC	Funktionelle Vitalkapazität
ggf.	Gegebenen Falles
GIP	Giant cell interstitial pneumonia
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HE	Hämatoxylin-Eosin
HgCl ₂	Quecksilberchlorid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRCT	High Resolution Computertomographie
HU	Houndsfield Units
IL	Interleukin
ILD	Interstitial Lung Diseases
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis
LDH	Laktatdehydrogenase
LIP	Lymphoid Interstitial Pneumonia
MIP	Maximum Intensity Projection
NETT	National Emphysema Treatment Trial
NSIP	Nonspecific Interstitial Pneumonia
NLSL	National Synchrotron Light Source
OsO ₄	Osmiumtetroxid

PDGF	Plathled Derived Growth Faktor
PEEP	Positiver End-Exspiratorischer Druck
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RB-ILD	Respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease
Rr.	Rami
RV	Residualvolumen
s.	Siehe
Sog.	So genannt
Tab.	Tabelle
TGV	Thorakales Gasvolumen
TIFF	Tagged Image File Format
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF	Tumornekrosefaktor
UIP	Usual Intestinal Pneumonia
VC	Vitalkapazität
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V.	Vena
Vv.	Venae
WHO	World Health Organisation
z.B.	Zum Beispiel

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klassifizierung der DPLD.....	2
Abb. 2: Risikofaktoren einer IPF.....	4
Abb. 3: Stufenweise Diagnostik der IPF.....	7
Abb. 4: Darstellung der normalen vs. der emphysematösen Alveolen.....	10
Abb. 5: Morphologische Varianten des Lungenemphysems.....	10
Abb. 6: Aufbau des Micro-CT.....	19
Abb. 7: Phasendiagramm.....	25
Abb. 8: Makroskopische Ansicht der emphysematösen Lungenprobe und Radiographie.....	25
Abb. 9: Intervaskular kontrastierte Proben.....	26
Abb. 10: Histopathologische Abbildungen der verwendeten IPF Proben.....	28
Abb. 11: Schema zum Matching Histologie und Micro-CT Datensatz.....	31
Abb. 12: Binarisierung/ Treshold setzen.....	32
Abb. 13: Quantifizierungsprozess.....	32
Abb. 14: Edit Tool.....	33
Abb. 15: Übersicht über die Kontrollproben.....	35
Abb. 16: Vergleich der Gefäßarchitektur von Kontrolllungen und fibrotischen Lungen.....	36
Abb. 17: Übersicht über die Fibroseproben.....	37
Abb. 18: Gefäßdarstellung der fibrotischen Proben.....	38
Abb. 19: Gefäßdarstellung nach Voxelgröße.....	39
Abb. 20: Micro-CT Schnitt (A) mit korrespondierendem Histologie-Präparat (B).....	40
Abb. 21: Quantifizierung Air Space und Tissue Fraction.....	41
Abb. 22: Zusammenfassung Quantifizierung nach Fixierungsmethode.....	42
Abb. 23: Darstellung der emphysematösen Lungenproben.....	43
Abb. 24: Rekonstruktion eines Azinus.....	44
Abb. 25: Vergleichende Darstellung der verschiedenen Lungenproben und ihrer Pathologien.....	45
Abb. 26: Vergleich der 3 Diagnostiken HRCT, Micro-CT und Histologie.....	47
Abb. 27: Schichtdicke.....	48

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verminderte Lungenparameter bei IPF.....	7
Tab. 2: Überblick über Charakteristika der verschiedenen ILD in den bildgebenden Verfahren.....	8
Tab. 3: Eigenschaften der unterschiedlichen Emphysemtypen im HRCT.....	14
Tab. 4: Übersicht der Beatmungsparameter.....	23

8. Literaturverzeichnis

Adams C. W. M., Osmium tetroxide and the marchi method: reactions with polar and non-polar lipids, protein and polysaccharide, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 8 (4), S. 262-267.

Adamson I. Y., Drug-induced pulmonary fibrosis, *Environ Health Perspect*, 55, 1984, S. 25-36.

Adamson I. Y., Young L., Bowden D. H., Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis, *American Journal of Pathology*, 130 (2), 1988, S. 377-83.

Adelman A. G., Chertkow G., Hayton R. C., Familial fibrocystic pulmonary dysplasia, a detailed family study, *Canadian Medical Association Journal*, 95 (12), 1966, S. 603-610.

Akira M., Sakatani M., Ueda E., Idiopathic pulmonary fibrosis, progression of honeycombing at thin-section CT, *Radiology*, 189 (3), 1993, S. 687-691.

Alder J. K., Chen J.J., Lancaster L., Danoff S., Su S.C., Cogan J.D., et al., Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2008, 105(35), S.13051-13056.

American Thoracic Society (ATS), Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS), *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000; 161(2 Pt 1), S. 646-664.

American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002, 15;165(2), S. 277-304.

American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2003; 168(7), S.818-900.

- Aono Y., Nishioka Y., Inayama M., Ugai M., Kishi J., Uehara H., et al.** Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005, 171(11), S. 1279-1285.
- Arase Y., Suzuki F., Suzuki Y., Akuta N., Kobayashi M., Kawamura Y., et al.**, Hepatitis C virus enhances incidence of idiopathic pulmonary fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2008,14(38), S.5880-5886.
- Aribas O.K., Gormus N., Aydogdu K.D.**, Epidural emphysema associated with primary spontaneous pneumothorax, *The European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2001; 20(3), S.645-646.
- Armanios M.Y., Chen J.J., Cogan J.D., Alder J.K., Ingersoll R.G., Markin C., et al.**, Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 2007, 356(13), S. 1317-1326.
- Ashcroft T., Simpson J.M., Timbrell V.**, Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale, *Journal of Clinical Pathology*, 1988, 41(4), S. 467-470.
- Austin J.H., Muller N.L., Friedman P.J., Hansell D.M., Naidich D.P., Remy-Jardin M., et al.**, Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the Nomenclature Committee of the Fleischner Society, *Radiology*, 1996, 200(2), S.327-331.
- Barrett J.F., Keat N.**, Artifacts in CT: recognition and avoidance. *Radiographics*, 2004, 24(6), S. 1679-1691.
- Baumgartner K.B., Samet J.M., Coultas D.B., Stidley C.A., Hunt W.C., Colby T.V., et al.**, Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multi-center case-control study. Collaborating Centers, *American Journal of Epidemiology*, 2000, 152(4), S. 307-315.
- Baumgartner K.B., Samet J.M., Stidley C.A., Colby T.V., Waldron J.A.**, Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1997, 155(1), S.242-248.
- Beigelman-Aubry C., Hill C., Guibal A., Savatovsky J., Grenier P.A.**, Multi-detector row CT and postprocessing techniques in the assessment of diffuse lung disease, *Radiographics*, 2005, 25(6), S. 1639-1652.

- Bentley M.D., Jorgensen S.M., Lerman L.O., Ritman E.L., Romero J.C.,** Visualization of three-dimensional nephron structure with microcomputed tomography, *Anatomical record* (Hoboken), 2007, 290(3), S.277-283.
- Bergin C., Muller N., Nichols D.M., Lillington G., Hogg J.C., Mullen B., et al.,** The diagnosis of emphysema, A computed tomographic-pathologic correlation, *American Review of Respiratory Disease*, 1986, 133(4), S.541-546.
- Beshay M., Kaiser H., Niedhart D., Reymond M.A., Schmid R.A.,** Emphysema and secondary pneumothorax in young adults smoking cannabis, *The European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2007, 32(6), S. 834-838.
- Bjoraker J.A., Ryu J.H., Edwin M.K., Myers J.L., Tazelaar H.D., Schroeder D.R., et al.,** Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 157(1), S.199-203.
- Bonse U., Busch F.,** X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR), *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1996;65(1-2), S.133-169.
- Botter S.M., van Osch G.J., Waarsing J.H., Day J.S., Verhaar J.A., Pols H.A., et al.,** Quantification of subchondral bone changes in a murine osteoarthritis model using micro-CT, *Biorheology*, 2006, 43(3-4), S.379-388.
- Bray D.F., Bagu J., Koegler P.,** Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens, *Microscopy Research and Technique*, 1993,26(6), S.489-495.
- Cavanaugh D., Travis E.L., Price R.E., Gladish G., White R.A., Wang M., et al.,** Quantification of bleomycin-induced murine lung damage in vivo with micro-computed tomography, *Academic Radiology*, 2006, 13(12), S. 1505-1512.
- Cherniack R.M., Colby T.V., Flint A., Thurlbeck W.M., Waldron J.A., Ackerson L., et al.,** Correlation of structure and function in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995, 151(4), S.1180-1188.
- Christie J.D., Edwards L.B., Aurora P., Dobbels F., Kirk R., Rahmel A.O., et al.,** The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009, *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2009, 28(10), S. 1031-1049.

- Cisneros-Lira J., Gaxiola M., Ramos C., Selman M., Pardo A.,** Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2003, 285(4), S. L949-L956.
- Clementino-Luedemann T.N., Dabanoglu A., Ilie N., Hickel R., Kunzelmann K.H.,** Micro-computed tomographic evaluation of a new enzyme solution for caries removal in deciduous teeth, *Dental Materials Journal*, 2006, 25(4), S. 675-683.
- Coggle J.E., Lambert B.E., Moores S.R.,** Radiation effects in the lung, *Environmental Health Perspectives*, 1986, 70, S. 261-291.
- Cohen E.,** Surgical treatment of end stage emphysema, *Minerva Anestesiologica*, 2004, 70(5), S. 307-312.
- Corbett E., Glaisyer H., Chan C., Madden B., Khaghani A., Yacoub M.,** Congenital cutis laxa with a dominant inheritance and early onset emphysema, *Thorax*, 1994, 49(8), S.836-837.
- Cortell S,** Silicone rubber for renal tubular injection, *Journal of Applied Physiology*, 1969, 26(1), S. 158-159.
- Cote C., Zilberberg M.D., Mody S.H., Dordelly L.J., Celli B.,** Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD, *European Respiratory Journal*, 2007, 29(5), S. 923-929.
- Cote C.G., Celli B.R.,** BODE index: a new tool to stage and monitor progression of chronic obstructive pulmonary disease, *Pneumonologia i alergologia polska*, 2009, 77(3), S. 305-313.
- Coultas D.B., Hughes M.P.,** Accuracy of mortality data for interstitial lung diseases in New Mexico, USA, *Thorax*, 1996, 51(7), S. 717-720
- Coxson H.O., Hogg J.C., Mayo J.R., Behzad H., Whittall K.P., Schwartz D.A., et al.,** Quantification of idiopathic pulmonary fibrosis using computed tomography and histology, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1997, 155(5), S. 1649-1656.
- Criner G.J., Sternberg A.L,** National Emphysema Treatment Trial: the major outcomes of lung volume reduction surgery in severe emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 393-405.
- Cronkhite J.T., Xing C., Raghu G., Chin K.M., Torres F., Rosenblatt R.L., et al,** Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, 178(7), S. 729-737.

- Daniels C.E., Wilkes M.C., Edens M., Kottom T.J., Murphy S.J., Limper A.H., et al.,** Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis, *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114(9), S. 1308-1316.
- De Camp M.M., McKenna R.J., Deschamps C.C., Krasna M.J.,** Lung volume reduction surgery: technique, operative mortality, and morbidity, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 442-446.
- De Crespigny A., Bou-Reslan H., Nishimura M.C., Phillips H., Carano R.A., D'Arceuil H.E.,** 3D micro-CT imaging of the postmortem brain, *Journal of Neuroscience Methods*, 2008, 171(2), S. 207-213.
- Demedts M., Wells A.U., Anto J.M., Costabel U., Hubbard R., Cullinan P., et al.,** Interstitial lung diseases: an epidemiological overview, *The European Respiratory Journal*, 2001, 32, S. 2s-6s.
- Dempsey O.J., Kerr K.M., Gomersall L., Remmen H., Currie G.P.,** Idiopathic pulmonary fibrosis: an update, *The Quarterly journal of medicine*, 2006, 99(10), S. 643-654.
- Diaz P.T., Bruns A.S., Ezzie M.E., Marchetti N., Thomashow B.M.,** Optimizing bronchodilator therapy in emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 501-505.
- Diaz P.T., Clanton T.L., Pacht E.R.,** Emphysema-like pulmonary disease associated with human immunodeficiency virus infection, *Annals of Internal Medicine*, 1992, 116(2), S. 124-128.
- Duvall C.L., Taylor W.R., Weiss D., Guldberg R.E.,** Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2004, 287(1), S. H302-H310.
- Ebina M., Shimizukawa M., Shibata N., Kimura Y., Suzuki T., Endo M., et al.,** Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2004, 169(11), S. 1203-1208.
- Eden E., Mitchell D., Mehlman B., Khouli H., Nejat M., Grieco M.H., et al.,** Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1997, 156(1), S. 68-74.

- Engelen M.P., Schols A.M., Lamers R.J., Wouters E.F.,** Different patterns of chronic tissue wasting among patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Clinical Nutrition*, 1999, 18(5), S. 275-280.
- Engelke K., Karolczak M., Lutz A., Seibert U., Schaller S., Kalender W.,** Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure, *Radiologe*, 1999, 39(3), S. 203-312.
- Enomoto T., Usuki J., Azuma A., Nakagawa T., Kudoh S.,** Diabetes mellitus may increase risk for idiopathic pulmonary fibrosis, *Chest* 2003, 123(6), S. 2007-2011.
- Epler G.R., McLoud T.C., Gaensler E.A., Mikus J.P., Carrington C.B.,** Normal chest roentgenograms in chronic diffuse infiltrative lung disease, *New England Journal of Medicine*, 1978, 298(17), S. 934-939.
- Feldkamp L.A., Goldstein S.A., Parfitt A.M., Jesion G., Kleerekoper M.,** The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography, *Journal of Bone and Mineral Research*, 1989, 4(1), S. 3-11.
- Finkelstein R., Ma H.D., Ghezzi H., Whittaker K., Fraser R.S., Cosio M.G.,** Morphometry of small airways in smokers and its relationship to emphysema type and hyperresponsiveness, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995, 152(1), S. 267-276.
- Fletcher C., Peto R.,** The natural history of chronic airflow obstruction, *British Medical Journal*, 1977, 1(6077), S. 1645-1648.
- Ford N.L., Martin E.L., Lewis J.F., Veldhuizen R.A., Holdsworth D.W., Drangova M.,** Quantifying lung morphology with respiratory-gated micro-CT in a murine model of emphysema, *Physics in Medicine and Biology*, 2009, 54(7), S. 2121-2130.
- Fredin M.F., Hultin L., Hyberg G., Rehnstrom E., Hultgren Hornquist E., Melgar S., et al.,** Predicting and monitoring colitis development in mice by micro-computed tomography, *Inflammatory bowel disease*, 2008, 14(4), S. 491-499.
- Friedman P.J.,** Imaging studies in emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 494-500.
- Fritscher-Ravens A., Sriram P.V., Bobrowski C., Pforte A., Topalidis T., Krause C., et al.,** Mediastinal lymphadenopathy in patients with or without previous malignancy: EUS-

FNA-based differential cytodiagnosis in 153 patients, *The American Journal of Gastroenterology*, 2000, 95(9), S. 2278-2284.

Froese A.R., Ask K., Labiris R., Farncombe T., Warburton D., Inman M.D., et al., Three-dimensional computed tomography imaging in an animal model of emphysema, *European Respiratory Journal*, 2007, 30(6), S. 1082-1089.

Gamsu G., Salmon C.J., Warnock M.L., Blanc P.D., CT quantification of interstitial fibrosis in patients with asbestosis: a comparison of two methods, *American Journal of Roentgenology*, 1995, 164(1), S. 63-68.

Garcia C.K., Wright W.E., Shay J.W., Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging, *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(22), S. 7406-7416.

Garcia-Sanz A., Rodriguez-Barbero A., Bentley M.D., Ritman E.L., Romero J.C., Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats, *Hypertension*, 1998, 31(1 Pt 2), S. 440-444.

Geddes D.M., Webley M., Brewerton D.A., Turton C.W., Turner-Warwick M., Murphy A.H., et al., alpha 1-antitrypsin phenotypes in fibrosing alveolitis and rheumatoid arthritis, *Lancet*, 1977, 2(8047), S. 1049-1051.

Glüer C.C., Dix W.R., Engelke K., Graeff W., Kupper W., Stellmaschek K.H., A fast low-noise line scan x-ray detector, *American Association of Physicists in Medicine*, 1989, 16(1), S. 98-104.

Gribbin J., Hubbard R.B., Le Jeune I., Smith C.J., West J., Tata L.J., Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK, *Thorax*, 2006, 61(11), S. 980-985.

Gunther A., Enke B., Markart P., Hammerl P., Morr H., Behr J., et al., Safety and tolerability of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis: an open label study, *European Respiratory Journal*, 2007, 29(4), S. 713-719.

Gunther A., Lubke N., Ermert M., Schermuly R.T., Weissmann N., Breithecker A., et al., Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2003, 168(11), S. 1358-1365.

- Hamada K., Nagai S., Tanaka S., Handa T., Shigematsu M., Nagao T., et al.**, Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Chest*, 2007, 131(3), S. 650-656.
- Harris J.M., Cullinan P., McDonald J.C.**, Does cryptogenic fibrosing alveolitis carry an increased risk of death from lung cancer?, *The Journal of Epidemiology and Community Health*, 1998, 52(9), S. 602-603.
- Hayhurst M.D., MacNee W., Flenley D.C., Wright D., McLean A., Lamb D., et al.**, Diagnosis of pulmonary emphysema by computerised tomography, *Lancet*, 1984, 2(8398), S. 320-322.
- Heppleston A.G.**, Minerals, fibrosis, and the lung, *Environmental Health Perspectives*, 1991, 94, S. 149-168.
- Herold G., et.al.**, *Innere Medizin*, 2009, Köln
- Hersh C.P., De Meo D.L., Silverman E.K.**, National Emphysema Treatment Trial state of the art: genetics of emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 486-493.
- Hogg J.C., McDonough J.E., Sanchez P.G., Cooper J.D., Coxson H.O., Elliott W.M., et al.**, Micro-computed tomography measurements of peripheral lung pathology in chronic obstructive pulmonary disease, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2009, 6(6), S. 546-559.
- Houghton A.M., Quintero P.A., Perkins D.L., Kobayashi D.K., Kelley D.G., Marconcini L.A., et al.**, Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema, *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(3), S. 753-759.
- Hubbard R., Lewis S., Richards K., Johnston I., Britton J.**, Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis, *Lancet*, 1996, 347(8997), S. 284-289.
- Hubner R.H., Gitter W., El Mokhtari N.E., Mathiak M., Both M., Bolte H., et al.**, Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples, *Biotechniques*, 2008, 44(4), S. 507.
- Hunninghake G.W., Zimmerman M.B., Schwartz D.A., King T.E., Lynch J., Hegele R., et al.**, Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001, 164(2), S. 193-196.

- Ing A.J.**, Interstitial lung disease and gastroesophageal reflux, *The American Journal of Medicine*, 2001, 3;111 Suppl 8A, S. 41S-44S.
- Irion K.L., Hochegger B., Marchiori E., Porto Nda S., Baldisserotto Sde V., Santana P.R.**, Chest X-ray and computed tomography in the evaluation of pulmonary emphysema, *Brazilian Journal of Pulmonology*, 2007, 33(6), S. 720-732.
- Izbicki G., Or R., Christensen T.G., Segel M.J., Fine A., Goldstein R.H., et al.**, Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4-overexpressing and knockout mice, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2002, 283(5), S. L1110-L1116.
- Johnson M.A., Kwan S., Snell N.J., Nunn A.J., Darbyshire J.H., Turner-Warwick M.**, Randomised controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic fibrosing alveolitis, *Thorax*, 1989, 44(4), S. 280-288.
- Johnston I., Britton J., Kinnear W., Logan R.**, Rising mortality from cryptogenic fibrosing alveolitis, *British Medical Journal*, 1990, 301(6759), S. 1017-1021.
- Johnston I.D., Prescott R.J., Chalmers J.C., Rudd R.M.**, British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society, *Thorax*, 1997, 52(1), S. 38-44.
- Jorgensen S.M., Demirkaya O., Ritman E.L.**, Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT, *American Journal of Physiology*, 1998, 275(3 Pt 2), S. H1103-H1114.
- Kanamura S.**, Fixation of lung for electron microscopy. Fixation of fresh frozen sections with osmium tetroxide, *Bulletin of the Chest Disease Research Institute, Kyoto University Kyoto University*, 1972, 5(2), S. 93-96.
- Kanematsu T., Kitaichi M., Nishimura K., Nagai S., Izumi T.**, Clubbing of the fingers and smooth-muscle proliferation in fibrotic changes in the lung in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Chest*, 1994, 105(2), S. 339-342.
- Karau K.L., Molthen R.C., Dhyani A., Haworth S.T., Hanger C.C., Roerig D.L., et al.**, Pulmonary arterial morphometry from microfocal X-ray computed tomography, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2001, 281(6), S. H2747-H2756.

- Katzenstein A.L., Fiorelli R.F.**, Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance, *The American Journal of Surgical Pathology*, 1994, 18(2), S. 136-147.
- Katzenstein A.L., Myers J.L., Prophet W.D., Corley L.S., Shin M.S.**, Bronchiolitis obliterans and usual interstitial pneumonia. A comparative clinicopathologic study, *The American Journal of Surgical Pathology*, 1986, 10(6), S. 373-381.
- Katzenstein A.L., Myers J.L.**, Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 157(4 Pt 1), S. 1301-1315.
- Katzenstein A.L.**, Pathogenesis of "fibrosis" in interstitial pneumonia: an electron microscopic study, *Human Pathology*, 1985, 16(10), S. 1015-1024.
- Kawakami M., Matsuo Y., Yoshiura K., Nagase T., Yamashita N.**, Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(7), S. 1434-1438.
- Kazerooni E.A., Martinez F.J., Flint A., Jamadar D.A., Gross B.H., Spizarny D.L., et al.**, Thin-section CT obtained at 10-mm increments versus limited three-level thin-section CT for idiopathic pulmonary fibrosis: correlation with pathologic scoring, *American Journal of Roentgenology*, 1997, 169(4), S. 977-983.
- Keane M.P., Strieter R.M.**, The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease, *Respiratory Research*, 2002, 3, S. 5.
- Keogh B.A., Crystal R.G.**, Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders, *Thorax*, 1982, 37(1), S.1-10.
- Kinder B.W., Brown K.K., Schwarz M.I., Ix J.H., Kervitsky A., King T.E.**, Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis, *Chest*, 2008, 133(1), S. 226-232.
- Kinney J.H., Marshall G.W., Marshall S.J.**, Three-dimensional mapping of mineral densities in carious dentin: theory and method, *Scanning Microscopy*, 1994, 8(2), S. 197-195.
- Kinsella M., Muller N.L., Abboud R.T., Morrison N.J., Dy B.A.**, Quantitation of emphysema by computed tomography using a "density mask" program and correlation with pulmonary function tests, *Chest*, 1990, 97(2), S. 315-321.
- Kirkwood T.B.**, Understanding the odd science of aging, *Cell*, 2005, 120(4), S. 437-447.

- Kolb M., Margetts P.J., Anthony D.C., Pitossi F., Gauldie J.,** Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis, *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107(12), S. 1529-1536.
- Kuhn C., Boldt J., King T.E., Crouch E., Vartio T., McDonald J.A.,** An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis, *American Review of Respiratory Diseases*, 1989, 140(6), S. 1693-1703.
- Kuhn C., McDonald J.A.,** The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis, *The American Journal of Pathology*, 1991, 138(5), S. 1257-1265.
- Kwon K.Y., Park K.K., Chang E.S.,** Scanning electron microscopic study of capillary change in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Journal of Korean Medical Science*, 1991, 6(3), S. 234-245.
- Langheinrich A.C., Michniewicz A., Bohle R.M., Ritman E.L.,** Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice, *Atherosclerosis* 2007, 191(1), S.73-81.
- Langheinrich A.C., Michniewicz A., Sedding D.G., Walker G., Beighley P.E., Rau W.S., et al.,** Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E^(-/-)/low-density lipoprotein^(-/-) double knockout mice, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006, 26(2), S. 347-352.
- Langheinrich A.C., Vorman S., Seidenstucker J., Kampschulte M., Bohle R.M., Wienhard J., et al.,** Quantitative 3D micro-CT imaging of the human fetoplacental vasculature in intrauterine growth restriction, *Placenta*, 2008, 29(11), S. 937-941.
- Lawson W.E., Grant S.W., Ambrosini V., Womble K.E., Dawson E.P., Lane K.B., et al.,** Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF, *Thorax*, 2004, 59(11), S. 977-980.
- Lee H.J., Goo J.M., Kim N.R., Kim M.A., Chung D.H., Son K.R., et al.,** Semiquantitative measurement of murine bleomycin-induced lung fibrosis in vivo and postmortem conditions using microcomputed tomography: correlation with pathologic scores--initial results, *Investigative Radiology*, 2008, 43(6), S. 453-460.

- Li M., Abdollahi A., Grone H.J., Lipson K.E., Belka C., Huber P.E.,** Late treatment with imatinib mesylate ameliorates radiation-induced lung fibrosis in a mouse model, *Radiation Oncology*, 2009, 4, S. 66.
- Lindgren A., Stroh E., Montnemery P., Nihlen U., Jakobsson K., Axmon A.,** Traffic-related air pollution associated with prevalence of asthma and COPD/chronic bronchitis. A cross-sectional study in Southern Sweden, *International Journal of Health Geographics*, 2009, 8, S. 2.
- Litzlbauer H.D., Korbel K., Kline T.L., Jorgensen S.M., Eaker D.R., Bohle R.M., et al.,** Synchrotron-based micro-CT imaging of the human lung acinus, *The Anatomical Record (Hoboken)*, 2010, 293(9), S. 1607-1614.
- Litzlbauer H.D., Neuhaeuser C., Moell A., Greschus S., Breithecker A., Franke F.E., et al.,** Three-dimensional imaging and morphometric analysis of alveolar tissue from micro-focal X-ray-computed tomography, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006, 291(3), S. L535-L545.
- Lok S.S., Egan J.J.,** Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis, *Monaldi Archives for Chest Disease*, 2000, 55(2), S. 146-150.
- Low F.N.,** The electron microscopy of sectioned lung tissue after varied duration of fixation in buffered osmium tetroxide, *The Anatomical Record*, 1954, 120(4), S. 827-851.
- Lum H., Mitzner W.,** Effects of 10% formalin fixation on fixed lung volume and lung tissue shrinkage. A comparison of eleven laboratory species, *American Review of Respiratory Disease*, 1985, 132(5), S. 1078-1083.
- MacMillan J.M.,** Familial pulmonary fibrosis, *Diseases of the chest*, 1951, 20(4), S. 426-436.
- Mapel D.W., Hunt W.C., Utton R., Baumgartner K.B., Samet J.M., Coultas D.B.,** Idiopathic pulmonary fibrosis: survival in population based and hospital based cohorts, *Thorax*, 1998, 53(6), S. 469-476.
- Mapel D.W., Samet J.M., Coultas D.B.,** Corticosteroids and the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Past, present, and future, *Chest*, 1996, 110(4), S. 1058-1067.
- Markart P., Ruppert C., Wygrecka M., Schmidt R., Korfei M., Harbach H., et al.,** Surfactant protein C mutations in sporadic forms of idiopathic interstitial pneumonias, *European Respiratory Journal*, 2007, 29(1), S. 134-137.

- Marney A., Lane K.B., Phillips J.A., Riley D.J., Loyd J.E.,** Idiopathic pulmonary fibrosis can be an autosomal dominant trait in some families, *Chest*, 2001, 120(1 Suppl), S. 56.
- Marshall R.P., Puddicombe A., Cookson W.O., Laurent G.J.,** Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom, *Thorax*, 2000, 55(2), S. 143-146.
- Martin-Badosa E., Amblard D., Nuzzo S., Elmoutaouakkil A., Vico L., Peyrin F.,** Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT, *Radiology*, 2003, 229(3), S. 921-928.
- Marxen M., Thornton M.M., Chiarot C.B., Klement G., Koprivnikar J., Sled J.G., et al.,** MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging, *Medical Physics*, 2004, 31(2), S. 305-313.
- Mc Carroll J.R., Chandra A., Jones A.S., Berend N., Magnussen J.S., King G.G.,** Airway dimensions measured from micro-computed tomography and high-resolution computed tomography, *European Respiratory Journal*, 2006, 28(4), S. 712-720.
- Merril C.R., Goldman D., Sedman S.A., Ebert M.H.,** Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins, *Science*, 1981, 211(4489), S. 1437-1438.
- Minai O.A., Benditt J., Martinez F.J.,** Natural history of emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 468-474.
- Mora J.I., Hadjiliadis D.,** Lung volume reduction surgery and lung transplantation in chronic obstructive pulmonary disease, *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2008, 3(4), S. 629-635.
- Muller N.L., Coiby T.V.,** Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings, *Radiographics*, 1997, 17(4), S. 1016-1022.
- Muller N.L., Guerry-Force M.L., Staples C.A., Wright J.L., Wiggs B., Coppin C., et al.,** Differential diagnosis of bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia and usual interstitial pneumonia: clinical, functional, and radiologic findings, *Radiology*, 1987, 162(1 Pt 1), S. 151-156.
- Mura M., Zompatori M., Pacilli A.M., Fasano L., Schiavina M., Fabbri M.,** The presence of emphysema further impairs physiologic function in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Respiratory Care*, 2006, 51(3), S. 257-265.

- Murray C.J., Lopez A.D.**, Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study, *Lancet*, 1997, 349(9064), S. 1498-1504.
- Myers J.L., Katzenstein A.L.**, Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia, *Chest*, 1988, 94(6), S. 1309-1311.
- Nagai A., Chiyotani A., Nakadate T., Konno K.**, Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1992, 167(3), S. 231-237.
- Nordsletten D.A., Blackett S., Bentley M.D., Ritman E.L., Smith N.P.**, Structural morphology of renal vasculature, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2006, 291(1), S. H296-H309.
- Orens J.B., Kazerooni E.A., Martinez F.J., Curtis J.L., Gross B.H., Flint A., et al.**, The sensitivity of high-resolution CT in detecting idiopathic pulmonary fibrosis proved by open lung biopsy. A prospective study, *Chest*, 1995, 108(1), S. 109-115.
- Ortiz M.C., Garcia-Sanz A., Bentley M.D., Fortepiani L.A., Garcia-Estan J., Ritman E.L., et al.**, Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation, *Kidney International*, 2000, 58(4), S. 1632-1640.
- Parameswaran H., Bartolak-Suki E., Hamakawa H., Majumdar A., Allen P.G., Suki B.**, Three-dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT, *Journal of Applied Physiology*, 2009, 107(2), S. 583-592.
- Park J., Kim D.S., Shim T.S., Lim C.M., Koh Y., Lee S.D., et al.**, Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *European Respiratory Journal*, 2001, 17(6), S. 1216-1219.
- Park J.H., Kim D.S., Park I.N., Jang S.J., Kitaichi M., Nicholson A.G., et al.**, Prognosis of fibrotic interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease-related subtypes *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 175(7), S. 705-711.
- Peao M.N., Aguas A.P., de Sa C.M., Grande N.R.**, Neof ormation of blood vessels in association with rat lung fibrosis induced by bleomycin, *Anatomic Record*, 1994, 238(1), S. 57-67.
- Peters S.G., McDougall J.C., Douglas W.W., Coles D.T., De Reme e R.A.**, Colchicine in the treatment of pulmonary fibrosis, *Chest*, 1993, 103(1), S. 101-104.

- Peterson M.W., Monick M., Hunninghake G.W.**, Prognostic role of eosinophils in pulmonary fibrosis, *Chest*, 1987, 92(1), S. 51-56.
- Pickrell J.A., Harris D.V., Mauderly J.L., Hahn F.F.**, Altered collagen metabolism in radiation-induced interstitial pulmonary fibrosis, *Chest*, 1976, 69(2 Suppl), S. 311-316.
- Pinsker K.L., Schneyer B., Becker N., Kamholz S.L.**, Usual interstitial pneumonia following Texas A2 influenza infection, *Chest*, 1981, 80(2), S. 123-126.
- Plathow C., Li M., Gong P., Zieher H., Kiessling F., Peschke P., et al.**, Computed tomography monitoring of radiation-induced lung fibrosis in mice, *Investigative Radiology*, 2004, 39(10), S. 600-609.
- Postnov A.A., Meurrens K., Weiler H., Van Dyck D., Xu H., Terpstra P., et al.**, In vivo assessment of emphysema in mice by high resolution X-ray microtomography, *Journal of Microscopy*, 2005, 220(Pt 1), S. 70-75.
- Prasse A., Muller K.M., Kurz C., Hamm H., Virchow J.C.**, Does interferon-gamma improve pulmonary function in idiopathic pulmonary fibrosis?, *European Respiratory Journal*, 2003, 22(6), S. 906-911.
- Rabe K.F., Hurd S., Anzueto A., Barnes P.J., Buist S.A., Calverley P., et al.**, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 176(6), S. 532-555.
- Raghu G., Freudenberger T.D., Yang S., Curtis J.R., Spada C., Hayes J., et al.**, High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis, *European Respiratory Journal*, 2006, 27(1), S. 136-142.
- Raghu G., Mageto Y.N., Lockhart D., Schmidt R.A., Wood D.E., Godwin J.D.**, The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study, *Chest*, 1999, 116(5), S. 1168-1174.
- Raghu G.**, The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Medicine*, 2003, 115, S. 60-64.
- Rau W.S., Hauenstein K., Volk P., Mittermayer C.**, Investigation of radiologic lung fine structure by freezing of inflated specimens in liquid nitrogen, *RöFo – Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, 1980, 133(4), S. 400-405.

- Rau W.S., Mittermayer C.**, Volume controlled fixation of the lung by formalin vapor, *RöFo* – Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren, 1980, 133(3), S. 233-239.
- Remy-Jardin M., Giraud F., Remy J., Copin M.C., Gosselin B., Duhamel A.**, Importance of ground-glass attenuation in chronic diffuse infiltrative lung disease: pathologic-CT correlation, *Radiology*, 1993, 189(3), S. 693-698.
- Ries A.L., Make B.J., Reilly J.J.**, Pulmonary rehabilitation in emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(4), S. 524-529.
- Ritman E.L.**, Micro-computed tomography-current status and developments, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004, 6, S. 185-208.
- Rodriguez L.H., Vargas P.F., Raff U., Lynch D.A., Rojas G.M., Moxley D.M., et al.**, Automated discrimination and quantification of idiopathic pulmonary fibrosis from normal lung parenchyma using generalized fractal dimensions in high-resolution computed tomography images, *Academic radiology*, 1995, 2(1), S. 10-18.
- Ruegsegger P., Koller B., Muller R.**, A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture, *Calcified Tissue International*, 1996, 58(1), S. 24-29.
- Sabit R., Bolton C.E., Edwards P.H., Pettit R.J., Evans W.D., McEniery C.M., et al.**, Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 75(12), S. 1259-1265.
- Sahebjami H.**, Emphysema-like changes in HIV, *Annals of Internal Medicine*, 1992, 116(10), S. 876.
- Salvioli B., Belmonte G., Stanghellini V., Baldi E., Fasano L., Pacilli A.M., et al.**, Gastrooesophageal reflux and interstitial lung disease, *Digestive and Liver Disease*, 2006, 38(12), S. 879-884.
- Sanders C.**, The radiographic diagnosis of emphysema, *Radiologic Clinics of North America*, 1991, 29(5), S. 1019-1030.
- Sandhaus R.A.**, Alpha1-Antitrypsin deficiency . 6: new and emerging treatments for alpha1-antitrypsin deficiency, *Thorax*, 2004, 59(10), S. 904-909.
- Schraufnagel D.E., Mehta D., Harshbarger R., Treviranus K., Wang N.S.**, Capillary remodeling in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *American Journal of Pathology*, 1986, 125(1), S. 97-106.

- Scott J., Johnston I., Britton J.**, What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust, *British Medical Journal*, 1990, 301, S. 1015-1017.
- Seeger W., Matthys H.**, *Klinische Pneumologie*, 4. Auflage, 2008. Berlin, Springer.
- Seersholm N., Dirksen A., Kok-Jensen A.**, Airways obstruction and two year survival in patients with severe alpha 1-antitrypsin deficiency, *European Respiratory Journal*, 1994, 7(11), S. 1985-1987.
- Selman M., King T.E., Pardo A.**, Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy, *Annals of Internal Medicine*, 2001, 134(2), S. 136-151.
- Selman M., Pardo A.**, Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder, *Respiratory Research*, 2002, 3, S. 3.
- Shofer S., Badea C., Qi Y., Potts E., Foster W.M., Johnson G.A.**, A micro-CT analysis of murine lung recruitment in bleomycin-induced lung injury, *Journal of Applied Physiology*, 2008, 105(2), S. 669-677.
- Staples C.A., Muller N.L., Vedal S., Abboud R., Ostrow D., Miller R.R.**, Usual interstitial pneumonia: correlation of CT with clinical, functional, and radiologic findings, *Radiology*, 1987, 162(2), S. 377-381.
- Steele M.P., Speer M.C., Loyd J.E., Brown K.K., Herron A., Slifer S.H., et al.**, Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005, 172(9), S. 1146-1152.
- Strieter R.M.**, Mechanisms of pulmonary fibrosis: conference summary, *Chest*, 2001, 120(1 Suppl), S. 77-85.
- Strollo D.C.**, Imaging of idiopathic interstitial lung diseases. Concepts and conundrums, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2003, 29(3 Suppl), S. 10-18.
- The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group**, Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158(1), S. 49-59.
- Symposium of Emphysema and the "Chronic Bronchitis" Syndrome**, *American Review of Respiratory Disease*, 1959, 80, S. 1-213.

- Tabata C., Tabata R., Kadokawa Y., Hisamori S., Takahashi M., Mishima M., et al.,** Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *The Journal of Immunology*, 2007, 179(1), S. 708-714.
- Takahashi M., Fukuoka J., Nitta N., Takazakura R., Nagatani Y., Murakami Y., et al.,** Imaging of pulmonary emphysema: a pictorial review, *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 2008, 3(2), S. 193-204.
- Tang Y.W., Johnson J.E., Browning P.J., Cruz-Gervis R.A., Davis A., Graham B.S., et al.,** Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Journal of clinical microbiology*, 2003, 41(6), S. 2633-2640.
- Taraseviciene-Stewart L., Douglas I.S., Nana-Sinkam P.S., Lee J.D., Tuder R.M., Nicolls M.R., et al.,** Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease?, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2006, 3(8), S. 687-690.
- Taraseviciene-Stewart L., Voelkel N.F.,** Molecular pathogenesis of emphysema, *The Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(2), S. 394-402.
- Taskar V.S., Coultas D.B.,** Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease?, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2006, 3(4), S. 293-298.
- Taylor M.D., Roberts J.R., Hubbs A.F., Reasor M.J., Antonini J.M.,** Quantitative image analysis of drug-induced lung fibrosis using laser scanning confocal microscopy, *The Journal of Toxicological Sciences*, 2002, 67(2), S. 295-302.
- The American Society for Transplant Physicians (ASTP)/American Thoracic Society(ATS)/European Respiratory Society(ERS)/International Society for Heart and Lung Transplantation(ISHLT),** International guidelines for the selection of lung transplant candidates. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158(1), S. 335-339.
- Thomas A.Q., Lane K., Phillips J., Prince M., Markin C., Speer M., et al.,** Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, 165(9), S. 1322-1328.
- Thurlbeck W.M., Muller N.L.,** Emphysema: definition, imaging, and quantification, *American Journal of Roentgenology*, 1994, 163(5), S. 1017-1025.

- Thurlbeck W.M., Simon G.,** Radiographic appearance of the chest in emphysema, *American Journal of Roentgenology*, 1978, 130(3), S. 429-440.
- Tsakiri K.D., Cronkhite J.T., Kuan P.J., Xing C., Raghu G., Weissler J.C., et al.,** Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2007, 104(18), S. 7552-7557.
- Tuder R.M., Yoshida T., Arap W., Pasqualini R., Petrache I.,** State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2006, 3(6), S. 503-510.
- Turner-Warwick M., Burrows B., Johnson A.,** Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival, *Thorax*, 1980, 35(3), S. 171-180.
- Turner-Warwick M., Haslam P.L.,** The value of serial bronchoalveolar lavages in assessing the clinical progress of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis, *American Review of Respiratory Disease*, 1987, 135(1), S. 26-34.
- Veeraraghavan S., Latsi P.I., Wells A.U., Pantelidis P., Nicholson A.G., Colby T.V., et al.,** BAL findings in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia, *European Respiratory Journal*, 2003, 22(2), S. 239-244.
- Voelkel N., Taraseviciene-Stewart L.,** Emphysema: an autoimmune vascular disease?, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, 2(1), S. 23-25.
- Vuorinen K., Gao F., Oury T.D., Kinnula V.L., Myllarniemi M.,** Imatinib mesylate inhibits fibrogenesis in asbestos-induced interstitial pneumonia, *Experimental Lung Research*, 2007, 33(7), S. 357-373.
- Waarsing J.H., Day J.S., Weinans H.,** Longitudinal micro-CT scans to evaluate bone architecture, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2005, 5(4), S. 10-12.
- Walter N., Collard H.R., King T.E.,** Current perspectives on the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2006, 3(4), S. 330-338.
- Wang X., Masse D.B., Leng H., Hess K.P., Ross R.D., Roeder R.K., et al.,** Detection of trabecular bone microdamage by micro-computed tomograph, *The Journal of Biomechanics*, 2007, 40(15), S. 3397-3403.
- Wangensteen D., Bachofen H., Weibel E.R.,** Effects of glutaraldehyde or osmium tetroxide fixation on the osmotic properties of lung cells, *Journal of Microscopy*, 1981, 124(Pt 2), S. 189-196.

- Warren C.P.**, The nature and causes of chronic obstructive pulmonary disease: a historical perspective. The Christie Lecture 2007, Chicago, USA, Canadian Respiratory Journal, 2009, 16(1), S. 13-20.
- Watz H., Breithecker A., Rau W.S., Kriete A.**, Micro-CT of the human lung: imaging of alveoli and virtual endoscopy of an alveolar duct in a normal lung and in a lung with centrilobular emphysema--initial observations, Radiology, 2005 , 236(3), S. 1053-1058.
- Weibel E.R., Crystal R.G, West J.B., Barnes P.J.**, Design of Airways and Blood Vessels considered as Branching Trees, The Lung: Scientific Foundations eds. 1, Lippincott-Raven Philadelphia, 1997, S. 1061-1071
- Weisbrod G.L., Rahman M., Chamberlain D., Herman S.J.**, Precocious emphysema in intravenous drug abusers, Journal of Thorac Imaging, 1993, 8(3), S. 233-240.
- Wells A.U., Hansell D.M., Rubens M.B., Cullinan P., Haslam P.L., Black C.M., et al.**, Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. Bronchoalveolar lavage findings in relation to computed tomographic appearance, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1994, 150(2), S. 462-468.
- Wells C., Mannino D.M.**, Pulmonary fibrosis and lung cancer in the United States: analysis of the multiple cause of death mortality data, 1979 through 1991, Southern Medical Journal, 1996, 89(5), S. 505-510.
- Welsch U.**, Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. 2. Auflage ed. 2005.
- Whyte M., Hubbard R., Meliconi R., Whidborne M., Eaton V., Bingle C., et al.**, Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000, 162(2 Pt 1), S. 755-758.
- Wietholt C., Roerig D.L., Gordon J.B., Haworth S.T., Molthen R.C., Clough A.V.**, Bronchial circulation angiogenesis in the rat quantified with SPECT and micro-CT, European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2008, 35(6), S. 1124-1132.
- Wintermark M., Jawadi S.S., Rapp J.H., Tihan T., Tong E., Glidden D.V., et al.**, High-resolution CT imaging of carotid artery atherosclerotic plaques, American Journal of Neuroradiology, 2008, 29(5), S. 875-882.

- Xaubet A., Agusti C., Luburich P., Roca J., Monton C., Ayuso M.C., et al.**, Pulmonary function tests and CT scan in the management of idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158(2), S. 431-436.
- Yonemaru M., Kasuga I., Kusumoto H., Kunisawa A., Kiyokawa H., Kuwabara S., et al.**, Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis, *European Respiratory Journal*, 1997, 10(9), S. 2040-2045.
- Yong H.S., Kang E.Y., Kim Y.K., Woo O.H., Shin B.K., Oh C.H., et al.**, Phase contrast microradiography of mouse lung using synchrotron X-ray: correlation with optical microscopy, *Yonsei Medical Journal*, 2009, 50(3), S. 422-426.
- Young S., Kretlow J.D., Nguyen C., Bashoura A.G., Baggett L.S., Jansen J.A., et al.**, Microcomputed tomography characterization of neovascularization in bone tissue engineering applications, *Tissue Engineering Part B-reviews*, 2008 Sep, 14(3), S. 295-306.
- Zavaletta V.A., Bartholmai B.J., Robb R.A.**, High resolution multidetector CT-aided tissue analysis and quantification of lung fibrosis, *Academic Radiology*, 2007, 14(7), S. 772-787.
- Zuo F., Kaminski N., Eugui E., Allard J., Yakhini Z., Ben-Dor A., et al.**, Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2002, 99(9), S. 6292-6297.

9. Anhang

9.1 Übersicht über die Proben zur Darstellung und Quantifizierung des Parenchyms

Parenchym	Pat. Nr.	Laufende Probennr.	Kontrastierung
Kontrolle	1	1	Osmium
	2	2	Osmium
	3	3	Osmium
Fibrose	43	4	Nativ
		5	Osmium
		6	Osmium
		7	Osmium
		8	Osmium
	45	9	Nativ
		10	Osmium
		11	Osmium
		12	Osmium
	52	13	Nativ
		14.1*	Nativ
		15	Osmium
		16	Osmium
		14.2*	Quecksilberchlorid
17		Quecksilberchlorid	
Emphysem	4	18	Osmium
		19	Osmium
		20	Osmium
		21	Osmium
		22	Osmium
		23	Osmium
		24	Osmium
		25	Osmium
		26	Osmium
		27	Osmium
Gesamt	7	27*	

9.2 Übersicht über die Proben zur Darstellung und Quantifizierung der Gefäße

Gefäße	Pat. Nr.	Laufende Probennr.	Kontrastierung
Kontrolle	3857	28	Microfil
		29	Microfil
	4134*	30	Microfil
		31	Microfil
		32	Microfil
	4560*	33	Microfil
		34	Microfil
		35	Microfil
		36	Microfil
		37	Microfil
		38	Microfil
		39	Microfil
		40	Microfil
	4649	41	Microfil
		42	Microfil
		43	Microfil
		44	Microfil
	6852	45	Microfil
		46	Microfil
	Fibrose	4006	47
48			Microfil
49			Microfil
4134*		50	Microfil
		51	Microfil
		52	Microfil
4560*		53	Microfil
	54	Microfil	
6852	55	Microfil	
Gesamt	7	28	

10. Publikationen

10.1 Originalarbeiten

Quantitative 3D micro-CT imaging of human lung tissue. Kampschulte M, Schneider CR, Litzlbauer HD, Tscholl D, Schneider C, Zeiner C, Krombach GA, Ritman EL, Bohle RM, Langheinrich AC.

Rofo. 2013 Sep;185(9):869-76.

10.2 Vorträge

Quantitative 3D-Micro-CT Imaging of the Human Lung Fibrosis:

SkyScan User Meeting, 2009 , Ghent, Belgien

Deutscher Röntgenkongress 2010, Berlin, Deutschland

10.3 Preise

SkyScan User Meeting in Ghent, April 2009, Preis "best Picture"

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Leun, den 01.04.2013

Claudia Rebecca Schneider

12. Danksagung

Ich möchte mich bei einigen Personen an dieser Stelle persönlich und herzlich bedanken für die Unterstützung, die die Durchführung dieser Arbeit möglich gemacht haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Alexander Claus Langheinrich für die Überlassung des Themas, die prompte, unkomplizierte Hilfe bei Fragen und Problemen und die große Unterstützung bei der Vorbereitung des Scyscan Usermeetings.

Gleichzeitig danke ich Herrn Dr. med. Marian Kampschulte für die umfassende individuelle Betreuung während des gesamten Arbeitsprozesses sowie die Vorbereitung der Veröffentlichung der Arbeit.

Außerdem danke ich allen, die an der Gewinnung und Bearbeitung und Bereitstellung der Proben in Gießen und Homburg/Saar beteiligt waren, insbesondere Herrn Carsten Zeiner und Herrn Prof. Dr. Rainer Maria Bohle.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Gunhild Martels für die Bedienung des Micro-CTs, und die kompetente Durchführung der Scans bedanken.

An die anderen Doktoranden des Teams insbesondere Annina Burkhardt sei ein herzlicher Dank die gute Zusammenarbeit, gegenseitige Motivation, Tipps und Ratschläge gewidmet.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, meinen Eltern für die Geduld, meinem Bruder Marius für den Crashkurs in Word und Excel, die Hilfe beim Erstellung des Layouts und der Grafiken sowie für das Korrekturlesen.

Meinem Freund Kim-Robert danke ich für das Meistern kleiner und großer Krisen, z. B. wenn das Inhaltsverzeichnis nicht funktionieren wollte oder das Quellenverwaltungsprogramm streikte.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**